



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA,
ESTOMATOLOGÍA, RADIOLOGÍA Y
MEDICINA FÍSICA

Evaluación Histológica de la Osteogénesis
Inducida por Flavonoides en comparación con
otro Estimulador Óseo en Alveolos post
extracción.

Estudio Experimental en Perros American Fox
Hound.

D. Manuel Máiquez Gosálvez

2015

Deseo expresar mi agradecimiento:

Al Dr. José Luis Calvo Guirado por haber puesto a mi disposición todos los medios posibles para llevar a cabo este trabajo. Por enseñarme el camino de la investigación. Por su aliento en los momentos de desconcierto. Por su confianza. Su generosidad. Su amistad. Y su tiempo.

Al Dr. Óscar Castro Reino por confiar en mí y enseñarme que la determinación es clave para alcanzar mis metas.

A todos los que de un modo u otro han contribuido a que esto sea posible.

A mi madre. A Vanessa. A toda mi familia.

“Todo nuestro conocimiento tiene su principio en los sentimientos”.

Leonardo Da Vinci

ABREVIATURAS

ALP	Fosfatasa alcalina	IGF	Factor de crecimiento insulínico
BA	8,8" Biapigenina	IL	Interleuquina
BMP	Proteínas morfogenéticas óseas	LPS	Lipopolisacáridos
CMO	Células de médula ósea	MCP	Proteína C morfogenética
COX	Ciclooxigenasa	OH	Residuos hidroxilo
DC	Células dendríticas	PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
DFDBA	Aloinjerto de hueso deshidratado congelado desmineralizado	PG	Prostaglandinas
DMSO	Dimetilsulfóxido	RA	Artritis reumatoide
ePTFE	Membrana de Politetrafluoretileno expandido	ROG	Regeneración ósea guiada
FDDBA	Aloinjerto de hueso deshidratado congelado	TGF-β	Factor de crecimiento y transformación beta
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico	TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
IFNγ	Interferón gamma	VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Concepto de cicatrización	2
1.2. Factores que intervienen en la cicatrización	2
1.2.1. Factores generales	
1.2.2. Factores locales	
1.3. Tipos de cicatrización	3
1.3.1. Cicatrización por primera intención	
1.3.2. Cicatrización por segunda intención	
1.4. Cicatrización ósea	4
1.4.1. Etapas de la cicatrización ósea	
1.4.1.1. Hematoma	
1.4.1.2. Tejido de granulación	
1.4.1.3. Callo óseo	
1.4.1.4. Unión ósea	
1.4.1.5. Remodelación ósea	
1.5. Bases de la regeneración ósea	8
1.5.1. Osteogénesis	
1.5.2. Osteoinducción	
1.5.3. Osteoconducción	
1.6. Cronología de la cicatrización post extracción	9
1.7. Estadios de Amler	14
1.8. Técnicas de regeneración ósea	15
1.8.1. Osteopromoción	
1.8.2. Osteodistracción	
1.9. Sustitutos óseos	16
1.9.1. Características ideales de un sustituto óseo	
1.10. Injertos óseos	17
1.10.1. Hueso autólogo o autógeno (Autoinjerto)	17
1.10.1.1. Fuentes de obtención del autoinjerto	
1.10.1.2. Tipos de autoinjerto	
1.10.1.3. Presentaciones del autoinjerto	
1.10.1.4. Ventajas del autoinjerto	
1.10.1.5. Inconvenientes del autoinjerto	
1.10.2. Hueso homólogo o alógeno (Aloinjerto)	22
1.10.2.1. Fuentes de obtención del aloinjerto	
1.10.2.2. Esterilización de los aloinjertos	
1.10.2.3. Conservación de los aloinjertos	

1.10.2.4.	Tipos de aloinjertos según su estructura	
1.10.2.5.	Tipos de aloinjertos según su conservación	
1.10.2.6.	Ventajas de los aloinjertos	
1.10.2.7.	Inconvenientes de los aloinjertos	
1.10.3.	Hueso heterólogo o xenólogo (Xenoinjerto)	30
1.10.3.1.	Tipos de Xenoinjertos según su origen	
1.10.3.1.1.	Hidroxiapatita coralina	
1.10.3.1.2.	Hidroxiapatita ficógena	
1.10.3.1.3.	Hidroxiapatita bovina	
1.10.3.1.3.1.	Presentaciones del hueso bovino	
1.10.3.1.3.2.	Ventajas del hueso bovino	
1.10.3.1.3.3.	Inconvenientes del hueso bovino	
1.11.	Materiales aloplásticos (Biomateriales)	38
1.12.	Flavonoides	42
1.12.1.	Generalidades de los flavonoides	
1.12.2.	Flavonoides del cacao	
1.12.3.	Flavonoides cítricos	
1.12.4.	Ácido rosmarínico	
1.12.5.	Apigenina	
1.12.5.1.	Efectos de la apigenina sobre el hueso	
1.12.5.1.1.	Actividad antiinflamatoria	
1.12.5.1.2.	Remodelación ósea	
1.12.5.1.3.	Osteoporosis	
1.12.5.1.4.	Artritis reumatoide	
1.12.5.2.	Otras aplicaciones médicas de la apigenina	
1.12.5.2.1.	Quimioterapia	
1.12.5.2.2.	Diabetes	
1.12.5.2.3.	Terapia inmunológica	
2.	JUSTIFICACIÓN	58
3.	OBJETIVOS	60
3.1.	Objetivo principal	
3.2.	Objetivos específicos	
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	61
4.1.	Animales de experimentación	
4.2.	Listado de materiales	
4.3.	Procedimiento quirúrgico	
4.4.	Toma de biopsias	
4.5.	Preparación de las muestras y análisis histológico	
4.6.	Análisis estadístico	
5.	RESULTADOS	68
5.1.	Microscopio óptico	
5.2.	Análisis histomorfométrico	

5.3.	Análisis estadístico	
5.3.1.	Frecuencias	
5.3.2.	Tabla de frecuencia	
5.3.3.	Histograma	
5.3.4.	Prueba T	
6.	DISCUSIÓN	100
7.	CONCLUSIONES	106
8.	BIBLIOGRAFÍA	107
9.	ANEXOS	140

FIGURAS

Figura 1. Tartrectomía con ultrasonidos	63
Figura 2. Radiografía intraoral preoperatoria	63
Figura 3. Planificación de la odontosección para no modificar la anatomía alveolar.	63
Figuras 4 y 5. Exodoncia bilateral de premolares P2, P3 y P4 y molares M1 y M2 inferiores.	64
Figura 6. Colocación de las esponjas con flavonoides.	64
Figuras 7 y 8. Despegamiento del colgajo para proceder a la toma de biopsias.	65
Figuras 9 y 10. Extracción del cilindro de hueso con trefina de Ø 3mm.	66
Figura 11. Conservación individual en formaldehído al 4%.	66
Figuras 12 y 13. Flavonoides 30 días (izquierda) y 60 días (derecha). Tinción azul de toluidina.	68
Figuras 14 y 15. Otro osteoinductor 30 días (izquierda) y 60 días (derecha). Tinción azul de toluidina.	70
Figuras 16-19. Flavonoides 30 días (superior izquierda) y 60 días (inferior izquierda). Otro osteoinductor 30 días (superior derecha) y 60 días (inferior derecha). HI: Hueso inmaduro desorganizado. MO: Médula ósea. HM: Hueso maduro organizado. Tinción azul de toluidina.	81
Figuras 20 y 21. Sin biomaterial 30 días (izquierda) y 60 días (derecha). HI: Hueso inmaduro desorganizado. MO: Médula ósea. HM: Hueso maduro organizado. Tinción hematoxilina-eosina.	81
Figuras 22 y 23. Sin biomaterial 30 días (izquierda) y 60 días (derecha). Tinción hematoxilina-eosina.	82

GRÁFICOS

Gráfico 1. Proporción de hueso vital, tejido conectivo y material remanente en los sitios tratados con aloinjertos.	28
Gráfico 2. Proporción de hueso vital, tejido conectivo y material remanente en alveolos tratados con Bio-Oss®.	37
Gráfico 3. Proporción de componentes histológicos en alveolos tratados con Bio-Oss®.	38
Gráfico 4. Flavonoides. Porcentaje de hueso inmaduro y tejido conectivo a los 30 días.	70
Gráfico 5. Otro osteoinductor. Porcentaje de hueso inmaduro y tejido conectivo a los 30 días.	72
Gráfico 6. Flavonoides. Porcentaje de hueso inmaduro y tejido conectivo a los 45 días.	74
Gráfico 7. Otro osteoinductor. Porcentaje de hueso inmaduro y tejido conectivo a los 45 días.	76
Gráfico 8. Flavonoides. Porcentaje de hueso inmaduro y tejido conectivo a los 60 días.	78
Gráfico 9. Otro osteoinductor. Porcentaje de hueso inmaduro y tejido conectivo a los 60 días.	80
Gráfico 10. Porcentaje de hueso inmaduro a 30, 45 y 60 días post extracción.	84
Gráfico 11. Gráfico P –P Normal de FLAVO30.	86
Gráfico 12. Gráfico P –P Normal sin tendencia de FLAVO30.	86
Gráfico 13. Gráfico P –P Normal de INDUCTOR30.	87

Gráfico 14. Gráfico P –P Normal sin tendencia de INDUCTOR30.	87
Gráfico 15. Gráfico P –P Normal de CONTROL30.	88
Gráfico 16. Gráfico P –P Normal sin tendencia de CONTROL30.	88
Gráfico 17. Histograma FLAVO30. Media = 33,18. Desviación típica = 3,153. N=10.	93
Gráfico 18. Histograma INDUCTOR30. Media = 22,90. Desviación típica = 5,91. N=10.	93
Gráfico 19. Histograma CONTROL30. Media = 57,40. Desviación típica = 2,307. N=10.	93
Gráfico 20. Histograma FLAVO45. Media = 18,87. Desviación típica = 4,60. N=10.	94
Gráfico 21. Histograma INDUCTOR45. Media = 9,88. Desviación típica = 1,42. N=10.	94
Gráfico 22. Histograma CONTROL45. Media = 35,30. Desviación típica = 1,232. N=10.	94
Gráfico 23. Histograma FLAVO60. Media = 7,61. Desviación típica = 3,655. N=10.	95
Gráfico 24. Histograma INDUCTOR60. Media = 6,14. Desviación típica = 1,95. N=10.	95
Gráfico 25. Histograma CONTROL60. Media = 8,17. Desviación típica = 1,31. N=10.	95

TABLAS

Tabla 1. Estudios que evalúan la utilización de xenoinjertos de origen bovino.	36
Tabla 2. Estudios que evalúan la utilización de injertos aloplásticos.	38
Tabla 3. Descripción de las características de diversos biomateriales.	41
Tabla 4. Cronograma del estudio experimental.	61
Tabla 5. Porcentaje de hueso inmaduro a los 30, 45 y 60 días post extracción. *P < 0.05.	84

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad es cada vez más frecuente encontrar pacientes en la consulta que presentan defectos óseos en tejidos orales y craneofaciales provocados por caries, traumatismos, infecciones, desarrollo esquelético anómalo u otras patologías que les pueden ocasionar una limitación funcional, estética y psicológica. La restauración de estos tejidos constituye un tema que implica la colaboración de distintos campos de la clínica, la ciencia básica y la ingeniería (**Pilipchuk, 2015**). Precisamente los pacientes con atrofia maxilar severa constituyen un grupo importante de sujetos con necesidades reconstructivas mediante, por ejemplo, una rehabilitación con implantes osteointegrados (**Candel-Marti, 2015; Beretta, 2015**). Sin embargo, careciendo de un soporte óseo adecuado, la consecución de una apropiada morfología ósea previa a la terapia implantológica debe estar basada en los injertos óseos.

No obstante la sustitución del tejido óseo constituye un problema aún no resuelto, que precisa de nuevas investigaciones sobre diversos materiales que sean capaces de sustituir dichos defectos y estimular el crecimiento del hueso huésped para alcanzar su reparación definitiva (**Mehdikhani-Nahrkhalaji, 2015**). Aunque este problema está parcialmente cubierto con la utilización de los injertos, dados los problemas intrínsecos que suelen conllevar este tipo de sustitutos, hacen precisa la búsqueda de nuevos materiales que imiten el proceso de reparación ósea natural.

Revisando la literatura podemos encontrar gran cantidad de biomateriales utilizados en técnicas de regeneración ósea como autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos, que están constituidos por materiales minerales desproteinizados con una estructura similar al hueso humano e injertos aloplásticos que incluyen metales, polímeros naturales y sintéticos, cerámicas y vidrios, que proporcionan la estructura física adecuada para la deposición de hueso nuevo (**Pérez-Sánchez, 2010**).

Pero es un hecho el que algunos investigadores han demostrado que sustancias de origen natural como la apigenina (**Bandyopadhyay, 2006; McKay, 2006; Park, 2008; Siddiqui, 2010; Jung, 2014**) posee efectos estimuladores a nivel óseo que pueden resultar prometedores en términos de neoformación ósea de los defectos y que centrarán nuestro estudio para concluir si su utilización constituye una alternativa real frente a otro tipo de injertos.

El propósito de este estudio es analizar la neoformación ósea que se produce tras colocar un flavonoide (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*) en alveolos post-extracción de perros American Fox Hound, con el fin de acortar los tiempos de espera para comenzar una rehabilitación con implantes osteointegrados, y comparar los

resultados obtenidos con biopsias de alveolos control (sin biomaterial) y otros con otro inductor (N-Acetyl-5-methoxytryptamine, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*).

1.1. CONCEPTO DE CICATRIZACIÓN

Es la respuesta local al daño tisular reflejada a modo de herida que en el ser humano se presenta como un conjunto de procesos celulares, vasculares y bioquímicos que se suceden en cadena, superponiéndose en el tiempo hasta completar el proceso de cicatrización, fenómeno que sigue a todo traumatismo accidental o quirúrgico (**Zihelli, 1991; Felzani, 2005**). La cicatrización completa puede obtenerse mediante dos procesos (**Mellonig, 1992**):

a) Reparación

Cuando el tejido lesionado es reemplazado por células que no cumplen la misma función de las del tejido al cual reemplazan.

b) Regeneración

Cuando el tejido lesionado recupera las condiciones de integridad del mismo antes de que fuese afectado, mediante la sustitución del tejido lesionado por otro funcional y morfológicamente similar al alterado.

1.2. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA CICATRIZACIÓN

(**Shafer, 1986; López, 1992; Bhaskar, 1993; Laskin, 1995; Roos y Rosmer, 1998; Regezi, 2000**)

1.2.1. Factores generales

- Carencia de proteínas y vitaminas. Puede impedir la síntesis de colágeno y de fibroblastos.
- Radioterapia. Altera el riego de los maxilares disminuyendo el potencial óseo para la reparación.
- Edad avanzada. Disminuye la actividad celular y por lo tanto la capacidad regeneradora.
- Trastornos metabólicos como diabetes e hipercalcemia. Afectan negativamente a la cicatrización porque disminuyen la respuesta frente a agentes infecciosos.

1.2.2. Factores locales

- Tipo de lesión.

- Tamaño.
- Contaminación de la herida por parte de bacterias o cuerpos extraños como la sutura. Causan infección y daños en el huésped.
- Deficiencia de aporte sanguíneo. La isquemia de los tejidos promueve la necrosis porque reduce el aporte de oxígeno y los nutrientes necesarios para la reparación de la herida. También impide la llegada de anticuerpos, leucocitos y medicación antibiótica, entre otros, incrementando las probabilidades de una infección. El tejido necrótico puede causar dos problemas: sirve de barrera que interfiere en la acción reparativa de las células y puede constituir un nicho importante para la proliferación de bacterias.
- Manipulación brusca de los bordes de la herida. Una excesiva tensión de la sutura produce isquemia e impide la cicatrización.
- Movimiento excesivo de la lesión.
- Radioterapia previa.

1.3. TIPOS DE CICATRIZACIÓN

El proceso de reparación es igual independientemente de la aproximación o no de los márgenes de la herida y se puede resumir como la formación y maduración del tejido de granulación con migración de los bordes epiteliales. La diferencia entre ambos radica en que por primera intención se acelera el proceso en cuanto al tiempo de curación, ya que existe menor separación entre los márgenes de la herida.

1.3.1. Cicatrización por primera intención

Este tipo de cicatrización ocurre cuando no ha habido pérdida de tejido en la herida y los márgenes de la misma se recolocan en la posición anatómica idéntica en la que se encontraban antes de producirse la lesión, contactando entre sí, independientemente de si son suturados o no. Este proceso de cicatrización es mucho más rápido ya que requiere una menor epitelización, depósito de colágeno, contracción y remodelación. El riesgo de producirse una infección es relativamente bajo y forma una cicatriz mucho menor comparada con las heridas que cicatrizan por segunda intención.

Ejemplos de este tipo son: reducción adecuada de fracturas de hueso, reposición de laceraciones, colgajos y reanastómosis anatómica de los nervios (Shafer, 1986; Zihelli, 1991; López, 1992; Laskin, 1995; Felzani, 2005).

1.3.2. Cicatrización por segunda intención

Tiene lugar cuando los márgenes de la herida no han sido correctamente reposicionados o cuando, a pesar de suturar, se produce una dehiscencia que termina ocasionando un cierre espontáneo (**López, 1992**). En este caso se evidencia la formación de un tejido de granulación que es el resultado de la proliferación conjuntiva y vascular.

De alguna manera, existe pérdida de tejido que determina una brecha entre los bordes de la herida. Suele aparecer en los tejidos poco flexibles y cuyos bordes no se pueden aproximar, y requiere la migración de gran cantidad de epitelio, colágeno, contracción y remodelación.

Esta cicatrización es mucho más lenta que la anterior y puede desarrollarse de un modo centrípeto, es decir, de los bordes de la herida hacia el centro partiendo de los islotes epiteliales, o centrífugo, hacia la periferia (**Felzani, 2005**). Por lo general produce una cicatriz de mayor tamaño que en el caso anterior y existe igualmente un mayor riesgo de infección en la herida.

Ejemplos de este tipo de cicatrización es la que tiene lugar en el alvéolo posterior a una exodoncia o fracturas pobremente reducidas con lesiones muy aparatosas y gran pérdida de tejido (**Shafer, 1986; López, 1992; Laskin, 1995; Regezi, 2000**).

1.4. CICATRIZACIÓN ÓSEA

El hueso es una variedad especializada de tejido conectivo formada por una matriz de cristales de hidroxapatita junto con una base rica de colágeno. La matriz ósea está compuesta por dos fases: orgánica (proteínas) e inorgánica (minerales). El elemento orgánico, la matriz, está formado principalmente por colágeno de tipo I enclavado en una sustancia fundamental que incluye en gran parte condroitin sulfato. La fase inorgánica está constituida de manera primaria por cristales de hidroxapatita y algunos elementos sueltos como carbonatos, citratos y sodio, entre otros (**Bernabéu, 2006**).

Las principales células que intervienen en la formación y remodelación ósea son los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Las células osteogénicas surgen de tres fuentes: periostio, endostio y células pluripotenciales circulantes. Los osteoclastos por su parte derivan de unos precursores celulares llamados monocitos, que tienen la función de reabsorber hueso necrótico y participar en la remodelación. Los osteoblastos también depositan hueso para iniciar la calcificación (**Zihelli, 1991; Felzani, 2005**). Peterson, Hupp, Ellis y Tucker sostienen que los eventos que ocurren en la cicatrización normal de los tejidos

blandos (inflamación, fibroplasia y remodelación) también tienen lugar en la regeneración ósea, excepto que en esta última hay calcificación de matriz de tejido conectivo (**Felzani, 2005**).

La cicatrización ósea se da por un proceso de regeneración, la cual es posible de obtener mediante la combinación de tres elementos: células viables, matriz extracelular, sustancias reguladoras insolubles (factores de crecimiento), y factores locales como el entorno mecánico y vascular. La combinación de todos ellos generará un ambiente apropiado para la regeneración ósea (**Anitua, 2000**).

La cicatrización ósea puede ser directa o indirecta según la configuración morfológica. La directa es de tipo intramembranoso y tiene lugar por remodelación intracortical, sin formación de cartílago intermedio y con los extremos óseos desorganizados unificados directamente por tejido osteoide. Aparece después de una correcta reposición anatómica y una adecuada ferulización del hueso fracturado. Por su parte la cicatrización ósea indirecta es de tipo endocondral y tiene lugar por la formación del callo óseo a partir del cartílago (**Fernández-Tresguerres, 2006; Solís, 2009**).

Según Hunter (**Laskin, 1995; Felzani, 2005**), el espacio comprendido entre las superficies fracturadas del hueso se rellena con sangre extravasada procedente de los vasos seccionados. Esta sangre se coagula y al cabo de un tiempo se vasculariza y, al igual que en la unión de las partes blandas, se constituye un callo. Entonces aparece una sustancia celular en cuyo interior las arterias depositan sustancias calcáreas que la transformarán, primero en cartílago y más tarde en hueso.

1.4.1. ETAPAS DE LA CICATRIZACIÓN ÓSEA

1.4.1.1. Hematoma

Cuando se produce una fractura, aparece de inmediato una intensa hemorragia como resultado de la rotura de numerosos vasos sanguíneos que discurren por el interior del hueso. Esta sangre extravasada difunde por los espacios trabeculares y genera un aumento de la tensión en toda la zona, con la consecuente elevación del periostio.

Cuando la sangre se coagula, el hematoma estará formado por los componentes hemáticos y por un exudado de células propias del proceso inflamatorio como los polimorfonucleares, linfocitos e histiocitos. El tejido lesionado se torna hipóxico y acidótico porque contiene una mezcla de plaquetas, leucocitos, hematíes y fibrina formando un coágulo que no es más

que una malla tridimensional biodegradable capaz de controlar la homeostasis de la herida y permitir el paso al exterior de los factores liberados por las plaquetas presentes en el coágulo (siendo los más significativos el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento y transformación beta 1 y 2 (TGF- β 1 Y TGF- β 2) y factor de crecimiento insulínico (IGF-I). Fundamentalmente los TGF- β y el IGF activan y favorecen la proliferación de las células madre, mientras que el PDGF realiza una acción quimiotáctica y de activación de macrófagos que serán una fuente de factores de crecimiento en las siguientes etapas de la regeneración ósea (**Zihelli, 1991; López, 1992; Fernández-Tresguerres, 2006**).

1.4.1.2. Tejido de granulación

Cuando dentro del hematoma disminuir los signos de inflamación, hacia los 3 a 5 días, se comienza a formar un tejido de granulación caracterizado por la presencia de abundantes capilares y una alta actividad fibroblástica. El tejido de granulación está formado por fibroblastos, macrófagos, isotipos de colágeno y nuevos vasos sanguíneos que comienzan a penetrar en dicho tejido aportando nutrientes, así como células indiferenciadas capaces de evolucionar hacia fenotipos osteoblásticos mediante la acción de diferentes factores morfodiferenciadores (proteínas morfogenéticas óseas, BMP) (**Zihelli, 1991; López, 1992; Felzani, 2005**). También en él se van a englobar los pequeños fragmentos óseos que se han desprendido de los bordes del hueso en el momento del traumatismo. Además, se pone en marcha un mecanismo de autoclasia, que implica no solamente la desaparición de estos fragmentos sino también una cierta reabsorción de los bordes de la fractura.

El tejido de granulación actúa como una matriz para poner en contacto los bordes de la fractura debajo del periostio. En los últimos períodos de la fase fibroblástica, el tejido conectivo se transforma en fibroso y una gran cantidad de colágeno debe ser depositado en la brecha de la fractura. Con la diferenciación gradual de las células y la acumulación de productos de secreción, los fibroblastos y los osteoblastos actúan produciendo una matriz de tejido fibroso que se extiende circunferencialmente dentro la herida hasta más allá de los bordes de la misma, formando lo que se conoce con el nombre de callo (**López, 1992**).

1.4.1.3. Callo óseo

Entre el día 10 y 14 posterior a la herida tiene lugar la formación del callo óseo que se compone de osteoblastos, sustancia intersticial fasciculada, hueso

plexiforme y corpúsculos óseos. A continuación se hace referencia a las dos vías que puede seguir la formación ósea:

- El tejido fibroso conectivo es el inductor de la formación de un tejido cartilaginoso que, al ir sufriendo un aumento en su vascularización y por acción de las células osteoblásticas, va remplazándose por hueso.
- El tejido fibroso conectivo puede pasar a la formación de hueso directamente sin la fase de cartílago por la aparición de la sustancia osteoide, producida por los osteoblastos, que se va calcificando lentamente (este es el proceso que suele seguir la mandíbula).

1.4.1.4. Unión ósea

El hueso neoformado que aparece pasadas las cuatro primeras semanas es desorganizado, con poca integridad estructural y sin canales de Havers (**López, 1992**). En este período es fundamental la presencia de factores de diferenciación como las proteínas morfogenéticas óseas BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6, BMP-7, relacionadas con la angiogénesis y diferenciación celular. Estas proteínas, junto con las TGF- β , el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y PDGF constituyen el equipo de señales paracrinas y autocrinas que permiten la reparación ósea entre las 6 y 8 semanas de producirse la lesión (**Shafer, 1986; Laskin, 1995**).

Este proceso depende del callo óseo que actúa como un núcleo que se va remodelando y reabsorbiendo poco a poco por la acción osteoblástica, formando hueso maduro que reemplaza al callo primario y restableciendo la arquitectura primitiva del hueso (**López, 1992**).

La formación de una estructura ósea similar a la original comienza entonces a través de la acción de las células óseas, osteoblastos y osteoclastos, reclutados y/o diferenciados mediante la combinación de los factores anteriormente mencionados (**Bhaskar 1993; Roos y Rosmer, 1998**).

1.4.1.5. Remodelación ósea

Es la última etapa del proceso de regeneración del hueso. En ella, la acción conjunta del IGF y de las BMP, transforman el hueso desorganizado en una estructura ya madura con canales de Havers (**Shafer, 1986; Laskin, 1995**). Durante esta etapa, el hueso que se ha formado desordenadamente es reabsorbido por los osteoclastos y, los osteoblastos, depositan nuevo hueso

para resistir pequeñas tensiones en el área de la fractura (**Fernández-Tresguerres, 2006**).

En conclusión, las diferentes fases de la reparación ósea están marcadas por la activa acción de los osteoblastos y osteoclastos que participan en la reconstrucción y remodelación del daño en el tejido óseo.

1.5. BASES DE LA REGENERACIÓN ÓSEA

Cuando un tejido sufre un daño estructural pueden ocurrir tres fenómenos: que aparezca una necrosis con pérdida progresiva del mismo, que comience un proceso de reparación mediante tejido cicatricial donde se produzca la restauración de dicho tejido sin que éste conserve su arquitectura y función originales, o que dé lugar a su regeneración originándose un nuevo tejido pero con todas las propiedades del original (**Lang, 2005**). Cuando ya se ha producido el daño tisular en nuestra práctica odontológica diaria, el objetivo será siempre conseguir la regeneración.

Las células del cuerpo se clasifican, según su capacidad para multiplicarse, en tres grupos: lábiles, estables y permanentes. Las células lábiles, como las del tejido epitelial, están continuamente dividiéndose. Las células estables, como las del tejido conectivo y óseo, pueden ser estimuladas a entrar en la fase S del ciclo celular para dividirse. Y las permanentes como las del tejido nervioso no se pueden dividir. Para conseguir la regeneración tisular obviamente también intervienen el aporte vascular y los factores mecánicos (**Jeffrey, 1999**).

Las técnicas de las que disponemos para conseguir la regeneración ósea se basan en la utilización de biomateriales y proteínas que aportan las señales estimuladoras para desencadenar el proceso de regeneración. Las células precursoras con capacidad de diferenciarse en osteoblastos, condroblastos, fibroblastos, mioblastos y adipocitos se encuentran en la médula ósea, si bien se ha demostrado la importancia que tienen los factores de crecimiento y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) en los procesos de proliferación, diferenciación y migración celular.

Las células precursoras osteogénicas se dividen en determinadas, que se hallan en médula ósea, endostio y periostio y poseen una capacidad intrínseca para diferenciarse en osteoblastos, e inducibles, que son células mesenquimáticas que pueden convertirse en células formadoras de hueso y están presentes en otros tejidos y órganos (**Lang, 2005**). Pero para que se produzca con éxito la regeneración ósea existen tres mecanismos: osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción.

1.5.1. Osteogénesis

Es la formación de hueso nuevo a través de los osteoblastos (**Anitua, 2000**) como ocurre en los casos de injertos de hueso autólogo donde se establece un remodelado que reabsorbe el material injertado y lo sustituye por hueso neoformado hasta conseguir la total integración del injerto.

1.5.2. Osteoinducción

Es el proceso de estimulación de la osteogénesis, es decir, la formación de hueso durante el desarrollo embrionario, o dicho de otro modo, el crecimiento y la reparación en tejidos donde originalmente no existe (**Anitua, 2000**). Es factible gracias a la liberación de proteínas BMP que favorecen la transformación de los fibroblastos del tejido conectivo en condroblastos y condrocitos del cartílago y que posteriormente son reemplazados por hueso.

1.5.3. Osteoconducción

Es la creación de una matriz o estructura en el defecto óseo apropiada para la formación de hueso nuevo por parte de los osteoblastos, sustituyendo progresivamente el material injertado (**Anitua, 2000; Lang, 2000**). Son ejemplos de materiales osteoconductores el hueso autólogo, la fibrina autóloga, la hidroxiapatita reabsorbible, el sulfato de calcio, el fosfato tricálcico, la fibrina liofilizada, el hueso desmineralizado y los cristales cerámicos bioactivos.

1.6. CRONOLOGÍA DE LA CICATRIZACIÓN POST EXTRACCIÓN

(**Amler, 1969; Cardaropoli, 2003; Schropp, 2003; Araujo y Lindhe, 2005; Trejo, 2005; Irinakis, 2006; Fickl, 2008**).

Tras realizar una exodoncia, el alvéolo se llena con sangre producto de la extravasación hemática como consecuencia de la rotura de los vasos sanguíneos que nutren al diente. Cuando se produce la coagulación de la sangre, quedan atrapados hematíes dentro de la red de fibrina y se produce el sellado de los vasos sanguíneos seccionados a nivel del ligamento periodontal.

Dentro de las primeras 24 o 48 horas, tiene lugar la alteración del lecho vascular mediante vasodilatación e ingurgitación de los vasos sanguíneos en los remanentes del ligamento periodontal y la movilización de leucocitos hacia la zona que rodea el coágulo.

De dos a cuatro días el coágulo muestra áreas de contracción y su superficie queda cubierta por una delgada capa de fibrina como resultado del comienzo de la actividad fibroblástica. Es importante reconocer que el debilitamiento del tejido gingival sin soporte es de gran ayuda para mantener el coágulo en posición.

Transcurridos siete días tiene lugar la proliferación de fibroblastos a partir de las células del tejido conectivo en el remanente del ligamento periodontal. El coágulo sanguíneo empieza a sufrir una organización mediante un crecimiento interno de los fibroblastos y de pequeños capilares procedentes del ligamento periodontal residual. Este coágulo forma un andamio sobre el cual pueden emigrar las células asociadas con el proceso de cicatrización. Sin embargo, es sólo una estructura temporal y poco a poco es reemplazada por tejido de granulación.

El epitelio de los márgenes de la herida muestra datos de proliferación en forma de actividad mitótica moderada y la cresta ósea del alveolo determina el comienzo de actividad osteoclástica. La proliferación de células endoteliales se puede ver en el área de ligamento periodontal y señalan el principio del crecimiento capilar.

Al final de este período se une una capa extremadamente gruesa de leucocitos sobre la superficie del coágulo y el borde de la herida muestra una proliferación epitelial. El componente inflamatorio disminuye y se incrementan las fibras colágenas en el tejido de granulación.

Durante la segunda semana después de la extracción del diente, el coágulo sanguíneo se organiza por el crecimiento de fibroblastos dentro del coágulo en una red fibrinosa. En esta etapa han penetrado nuevos capilares delicados hacia el centro del coágulo. Los remanentes del ligamento periodontal han sufrido degeneración gradual y no se reconocen como tal por mucho tiempo. En su lugar, la pared del alveolo óseo ahora parece ligeramente gastada. En algunas ocasiones se pueden ver trabéculas de osteoide y hueso inmaduro que aumentarán con el tiempo desde la base hasta la superficie del alveolo y desde su periferia hacia el centro.

La proliferación epitelial de la superficie de la herida es extensa aunque no llega a cubrirla totalmente, sobre todo en el caso de los dientes posteriores y multirradiculares. Sin embargo, en los alveolos más pequeños, se puede completar la epitelización. El margen del alveolo muestra una reabsorción osteoclástica prominente.

El coágulo original aparece casi completamente organizado por el tejido de granulación maduro. Se forman trabéculas de osteoide muy joven o hueso no calcificado alrededor de toda la periferia de la herida a partir de la pared del alveolo. Este hueso temprano está formado por los osteoblastos que derivan de

células pluripotenciales del ligamento periodontal original, las cuáles asumen una función de osteogénesis.

Además, las trabéculas óseas se disponen conforme a una estructura funcional para resistir las fuerzas tensionales que incidirán sobre la cresta alveolar. Cabe recordar que el hueso inmaduro no es tan radiopaco como el maduro. En consecuencia, un alveolo cicatrizado, pero que contiene hueso inmaduro, aparece relativamente radiolúcido en una radiografía. Así pues, podemos afirmar que la cicatrización de heridas post-extracción ocurre mucho antes de que se evidencie radiográficamente.

El hueso cortical original del alveolo sufre una remodelación de tal manera que la cresta es redondeada por la reabsorción osteoclástica. En ese momento, la superficie de la herida puede haberse reepitelizado por completo.

Durante la cuarta semana después de la exodoncia, la herida empieza la etapa final de la cicatrización, donde existe un continuo depósito y remodelado del hueso que ocupa el alveolo. Esta remodelación durará varias semanas más ya que gran cantidad del hueso nuevo se encuentra mal calcificado, como se hace evidente por la radiolucidez que presenta en una radiografía.

Las pruebas radiográficas de la formación de hueso no se hacen prominentes hasta la sexta u octava semana después de la extracción dental. En algunos casos, existen datos radiográficos más precoces de diferencias en el hueso nuevo del alveolo y el hueso vecino hasta cuatro a seis semanas después de la extracción.

Hasta pasados cuatro o seis meses después de la exodoncia la cortical de hueso no cubre todo el alvéolo. Esto se reconoce por una disminución en la densidad radiográfica de la lámina dura. Como el hueso llena el alvéolo, el epitelio migra a través de la cresta. La única evidencia visible después de un año es una pequeña cicatriz en el borde alveolar.

Se realizó un estudio clínico prospectivo (**Trombelli, 2008**) para evaluar el proceso de cicatrización de alveolos post exodoncia en seres humanos evidenciando procesos de modelado (cambio en tamaño y forma) y remodelado (reestructuración del tejido óseo existente). Fueron incluidos pacientes sistémicamente sanos, mayores de 18 años (rango entre 32 y 74 años) que aceptaron pertenecer al estudio aportando 27 muestras del tejido neoformado en el centro de los alveolos entre la segunda y la cuarta semana post exodoncia (n = 10, grupo de evaluación temprana), entre la sexta y la octava semana (n = 6, grupo de evaluación intermedia) y entre la duodécima y la vigesimocuarta semana (n = 11, grupo de evaluación tardía). Los alveolos correspondieron a dientes uni y multirradiculares y la toma de muestras histológicas se realizó en función de la necesidad quirúrgica del paciente (los procedimientos de cirugía periodontal fueron programados para los grupos de

evaluación temprana e intermedia y las cirugías de colocación de implantes para el grupo de evaluación tardía).

Las biopsias se obtuvieron con una trefina de 2 mm de diámetro introducida en el centro del alveolo y fueron realizadas pruebas para determinar el contenido celular a través del uso de anticuerpos monoclonales que promovieran la activación de marcadores de membrana en células endoteliales (CD31), osteoblastos (Osteocalcina y BMP-7), macrófagos (CD68) y osteoclastos (RANK/TNFRSF) (**Trombelli, 2008**).

La composición de las diferentes muestras obtenidas durante la fase de evaluación temprana (2 a 4 semanas post exodoncia) demostraron presencia de tejido de granulación en 4 de las 10 muestras, con un promedio equivalente al 35.9% del total de tejido neoformado. El 57.2% correspondió a tejido conectivo provisional neoformado (7 de las 10 muestras analizadas presentaron tejido conectivo) y 6.9% correspondía a hueso trabecular neoformado (presente en 6 de las 10 muestras). Ninguna de las muestras presentaba tejido compatible con hueso lamelar o medular ni fue posible identificar la presencia de fracciones de coágulo sanguíneo remanente (**Trombelli, 2008**).

Al evaluar las muestras correspondientes a la evaluación intermedia (entre 6 y 8 semanas post exodoncia), se encontró presencia de tejido de granulación en solo 1 de las 6 muestras analizadas, con un promedio equivalente al 3.8% del total de tejido neoformado. El 62.2%, en promedio, de las muestras analizadas correspondió a tejido conectivo provisional neoformado (presente en todas las muestras analizadas) y 34.0% correspondió a hueso trabecular neoformado (presente en 6 de las 6 muestras analizadas). Ninguna de las muestras correspondientes a la fase intermedia de cicatrización post exodoncia presentaba tejido compatible con hueso lamelar o medular (**Trombelli, 2008**).

Las muestras obtenidas entre las semanas 12 y 24 (grupo de evaluación tardía) presentaron 58.5%, en promedio, de tejido conectivo provisional neoformado (presente en 10 de las 11 muestras analizadas), 32.4% de hueso trabecular neoformado (presente en 10 de las 11 muestras analizadas) y 9.1% presentaba tejido compatible con hueso lamelar o medular (solo en 1 de las 11 muestras evaluadas, aunque en esta muestra, el 100% de la muestra correspondió a tejido lamelar y medular). Ninguna de las muestras correspondientes a la etapa tardía de evaluación presentaba remanentes de tejido de granulación (**Trombelli, 2008**).

La presencia de células endoteliales fue evidente en los tres períodos evaluados, aunque se presentó una leve disminución gradual en la proporción de células presentes por mm² (33.0, en promedio, en la fase temprana, 27.2 en la fase intermedia y 19.0 en la fase tardía). El comportamiento de los

macrófagos en los tres períodos fue similar al de las células endoteliales, con una disminución progresiva en los tres períodos evaluados, mientras que las células neoformadoras de tejido óseo fueron identificadas en mayor proporción durante la fase intermedia de cicatrización, con una leve disminución en la fase tardía. La proporción de osteoclastos en los tres momentos evaluados fue mínima (entre 1 y 3 células por mm²) (**Trombelli, 2008**).

Se realizó otro estudio prospectivo en el modelo animal cuyo objetivo era el de determinar si los cambios tridimensionales en el alveolo post exodoncia eran distintos al elevar o no elevar colgajos de espesor total durante el procedimiento quirúrgico (**Blanco, 2011**). Utilizaron 5 perros de raza Beagle, como el objeto de nuestro estudio, a los cuales les realizaron exodoncias de los terceros y cuartos premolares mandibulares de manera bilateral, elevando colgajos de espesor total solo en uno de los lados. Los dientes fueron extraídos utilizando una técnica mínimamente traumática para evitar daño a las tablas óseas. En el grupo en el cual fueron elevados colgajos de espesor total, en vestibular y en lingual, se estabilizaron los tejidos blandos con puntos de sutura simple.

Después de 3 meses, los perros fueron sacrificados y se obtuvieron cortes para realizar análisis histológico bajo microscopía electrónica de los sitios tratados. Las imágenes obtenidas fueron procesadas por ordenador y, a través del centro del reborde alveolar tratado, fue trazada una línea paralela al eje longitudinal. A partir de esta línea central fueron trazadas dos líneas perpendiculares para evaluar la diferencia en altura entre la cresta vestibular y la cresta lingual y para determinar, con otras tres líneas perpendiculares, el espesor vestibulo lingual del reborde a 1, 3 y 5 mm de la cresta lingual (**Blanco, 2011**).

Los autores reportan que no obtuvieron diferencias estadísticas ni clínicamente significativas entre los dos grupos y que, basados en sus resultados, las alteraciones en el reborde alveolar después de haber realizado exodoncias con elevación o sin elevación de colgajos, son muy similares.

La diferencia entre la altura de la cresta lingual y la cresta vestibular en el grupo en el que se elevaron colgajos fue de 1.48 mm, mientras que en el grupo control, la diferencia fue de 1.22 mm. El espesor del reborde 1 mm apical a la cresta lingual fue de 4.41 mm en el grupo experimental (con colgajo) y de 4.5 mm en el grupo control (sin colgajo), 5.72 mm y 5.58 mm respectivamente 3 mm apical a la cresta lingual y 6.67 mm y 6.44 mm 5 mm apical a la cresta lingual (**Blanco, 2011**).

1.7. ESTADIOS DE AMLER

Es una clasificación sobre las etapas de cicatrización de los alveolos post-extracción (**Amler, 1969**). Estos cinco estadios han sido identificados por exámenes histológicos realizados en animales de experimentación y en humanos. Los cambios morfológicos de los alvéolos post-extracción han sido descritos a través de radiografías, cefalometrías, estudios en modelos y medidas del alveolo mediante procedimientos quirúrgicos para acceder a él (**Solís, 2009**).

a) Primer estadio

Se forma inmediatamente un coágulo de células blancas y rojas, produciéndose hemostasia.

b) Segundo estadio

El tejido de granulación reemplaza al coágulo sobre el cuarto o quinto día. Se inicia la angiogénesis a través de la cadena de células endoteliales y formación de capilares.

c) Tercer estadio

El tejido conectivo reemplaza gradualmente al tejido de granulación en 14-16 días. Tiene lugar el recubrimiento epitelial completo.

d) Cuarto estadio

Inicio de calcificación de tejido osteoide, comenzando en la base y periferia del alveolo (7-10 días). A las 6 semanas, el hueso trabecular rellena casi al completo el alveolo. Máxima actividad osteoblástica, proliferación de elementos celulares y de tejido conectivo con osteoblastos debajo de tejido osteoide alrededor de lagunas inmaduras de hueso (desde la cuarta a la sexta semana postextracción). Tras la octava semana, la osteogénesis parece disminuir.

e) Quinto estadio

Tras cuatro o cinco semanas hay epitelización completa del alveolo. Relleno óseo completo entre la quinta y la décima semana. A las 16 semanas se completa el relleno óseo, con poca actividad osteogénica.

1.8. TÉCNICAS DE REGENERACIÓN ÓSEA

El tejido conectivo se regenera más rápidamente que el tejido óseo de manera que, cuando se produce un defecto óseo, durante el proceso de cicatrización acuden primero las células del tejido conectivo de revestimiento, impidiendo de este modo que las células óseas regeneren por completo el defecto. Dentro de los procesos regenerativos cabe destacar:

1.8.1. Osteopromoción

La osteopromoción o regeneración ósea guiada (ROG) es la capacidad de inducir la formación ósea mediante la utilización de barreras físicas, membranas reabsorbibles o no reabsorbibles, que permitan la angiogénesis por parte del lecho receptor y eviten la llegada de vasos a partir del tejido conectivo adyacente. Aunque la ROG es un procedimiento adecuado (**Buser, 1993**), se puede asociar al uso de injertos de forma que las membranas cumplirían la función añadida de preservar y estabilizar el injerto, y los materiales de injerto conseguirían mantener el espacio para así evitar el colapso (**Mattout, 2007**).

Podemos encontrar membranas de diferentes materiales y, en función de las características del defecto que tratamos de regenerar, nos decantamos por unas u otras. Las propiedades comunes que deben presentar estas membranas son biocompatibilidad, flexibilidad, adaptabilidad, conservación del espacio, efectividad como barrera celular, ausencia de citotoxicidad y protección del coágulo (**Mattout, 2007**).

Aunque el uso de membranas reabsorbibles o no reabsorbibles no altera el resultado final en términos de regeneración (**Coulthard, 2003; Merli, 2007**), cada una de ellas tiene ventajas e inconvenientes.

- Membranas reabsorbibles

Colágeno (*Geistlich Bio-Gide*[®]), ácido poliláctico y poliglicólico PGA-PLA (*Resolut*[®]), poliglactina 910 (*Vicryl*[®]), sulfato cálcico, hueso cortical desmineralizado (*Lambone*[®]), poliuretano, copolímeros, sulfato cálcico, duramadre, dermis porcina, fibrina autóloga y periostio son materiales de membranas reabsorbibles que precisan el uso de aditamentos igualmente reabsorbibles para su estabilización y no se puede conocer cuánto tiempo serán eficaces en su función oclusiva (**Esposito, 2008; Hämmerle, 2008**).

Incluso existe un mayor riesgo de que se inicie una infección en el defecto a regenerar porque las membranas reabsorbibles son permeables a

Streptococcus mutans y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (**Mattout, 2007**).

- **Membranas no reabsorbibles**

Politetrafluoretileno expandido ePTFE (*GoreTex*[®]), ePTFE con refuerzo de titanio (*GoreTex*[®]), NPTFE politetrafluoretileno expandido de alta densidad con poros nanométricos (*Teflon*[®]) y micromallas de titanio tienen el inconveniente de que pueden exponerse durante el proceso de cicatrización abriendo una comunicación con el medio oral que derive en una infección (**Becker, 1992; Coulthard, 2003; Merli, 2007**) y precise de una segunda cirugía para su retirada.

1.8.2. Osteodistracción

Consiste en provocar fractura mediante instrumental quirúrgico para separar los fragmentos de hueso y promover la formación de un puente óseo entre ellos (**Iliazarov, 1989**). Esta técnica comenzó a utilizarse en el área de traumatología pero su uso en cirugía bucal es relativamente reciente.

A pesar de que ambas técnicas son eficaces, si la comparamos con la ROG (**Esposito, 2006**) no queda claro cuál de las dos soluciona mejor el problema de pérdida de hueso vertical. Aunque el proceso de obtención del nuevo hueso es relativamente lento, no experimenta ninguna reabsorción posterior, resultando tan estable en el tiempo como el hueso original (**Chiapasco, 2007**).

1.9. SUSTITUTOS ÓSEOS

Son los tejidos y materiales que se utilizan para conseguir la regeneración de un defecto óseo (**Finkemeier, 2002**). Para elegir el más idóneo se deben tener en cuenta las propiedades, su biodisponibilidad, el defecto óseo donde será injertado y el coste del mismo (**Solís, 2009**).

1.9.1. Características ideales de un sustituto óseo

Existen dos tipos fundamentales sustitutos óseos: los injertos y los biomateriales. Las características ideales de un sustituto óseo son (**Haddad, 2006; Solís, 2009**):

- Facilidad para usar y manejar.

- No propenso a migrar o a la infección.
- Con una superficie capaz de liberar factores de crecimiento óseo en el área quirúrgica.
- Amplia disponibilidad.
- Que no transmita enfermedades infecciosas al paciente.
- Capaz de formar hueso para la posterior colocación de implantes.
- Osteogénico. Tener capacidad para producir hueso por proliferación celular de osteoblastos viables trasplantados.
- Osteoconductor. Proveer una matriz para el crecimiento de hueso nuevo a través de ella.
- Osteoinductor. Poseer la facultad de producir hueso por osteoinducción de las células mesenquimales recogidas en el injerto.
- Permitir la liberación de factores biológicos que estimulen la regeneración ósea.
- Proveer soporte mecánico y protección de estructuras más profundas durante la cicatrización ósea.
- Prevenir el crecimiento de tejido blando.
- Ser reemplazado por hueso nativo a través del tiempo.
- Mantenimiento del hueso regenerado maduro a través del tiempo sin que la función cause pérdida del mismo.

1.10. INJERTOS ÓSEOS

Son fragmentos de hueso que se implantan en un defecto para reparar una lesión. Además de su papel biológico, desempeñan también una función mecánica (Baar, 2006).

Los injertos óseos se clasifican en función de su origen en (Baar, 2006; Irinakis, 2006; Oporto-Venegas, 2008; Solís, 2008; Vargas, 2011):

- **Hueso autólogo o autógeno (Autoinjerto).** Procede del mismo individuo. Las células óseas vivas son trasplantadas de una parte a otra del mismo organismo.
- **Hueso homólogo o alógeno (Alloinjerto).** Procede de individuos de la misma especie, genéticamente diferentes.
- **Hueso heterólogo o xenógeno (Xenoinjerto).** Procede de individuos de especie diferente.

1.10.1. HUESO AUTÓLOGO O AUTÓGENO (AUTOINJERTO)

Origen	Capacidad	Inconvenientes
Hueso del paciente	Osteogénica	Morbilidad zona donante

Se considera el material de elección para la regeneración ósea por sus excelentes resultados ya que aún los procesos de osteogénesis, cuando las células mesenquimales del huésped invaden el injerto y se diferencian a osteoblastos (**Karring, 2000**), osteoinducción, porque durante la reabsorción el injerto experimenta una remodelación que conlleva la liberación de factores de crecimiento y BMPs procedentes de la matriz, y osteoconducción, ya que la propia estructura ósea del injerto actúa como matriz del hueso neoformado.

1.10.1.1. Fuentes de obtención del autoinjerto

Para obtener el autoinjerto en casos de pequeños defectos óseos se recurre a zonas donantes intraorales, pero en el caso de defectos más extensos es necesario obtenerlo de zonas donantes extraorales.

Siendo el paciente su propio donante, el hueso autólogo lo podemos obtener del lecho implantario, la sínfisis mentoniana, de los tori mandibulares, la rama ascendente mandibular, la tuberosidad (intraorales), la calota craneal, la cresta ilíaca, el sistema escapular y el peroné (extraorales). Las zonas donantes extraorales son las preferidas porque aportan mayor volumen de hueso medular, pero tienen el inconveniente de requerir anestesia general adicional en la mayoría de los casos. También resultan de gran utilidad en el tratamiento de pacientes con importantes atrofiaciones del proceso alveolar.

La obtención y aplicación de autoinjertos extraorales son procedimientos utilizados con frecuencia en cirugía maxilofacial como técnicas reconstructivas, tanto en pacientes que han sido sometidos a resecciones quirúrgicas por procesos neoplásicos como en aquellos que, debido a traumatismos presentan pérdidas extensas de hueso maxilar (**Irinakis, 2006; Van der Weijden, 2009; Nandi, 2010**).

1.10.1.2. Tipos de autoinjerto

Los autoinjertos están disponibles en varios tipos según su estructura: esponjoso, cortico-esponjoso, cortical vascularizado, cortical no vascularizado y hueso autólogo medular (**Finkemeier, 2002; Baar, 2006; Nandi, 2010**)

a) Autoinjerto esponjoso (trabecular)

El autoinjerto óseo esponjoso constituye el material de referencia con el que se comparan todos los sustitutos óseos (**Baar, 2006; Nandi, 2010**) porque posee el mayor poder osteogénico. Esto se debe a la capacidad para transferir células osteoprogenitoras a la zona receptora y

promover una neoformación ósea progresiva que no requiere pasar por el estadio de reabsorción osteoclástica (necesario para la incorporación de los aloinjertos). Además se revasculariza rápida y fácilmente, incorporándose al sitio receptor (**Finkemeier, 2002**).

Suele obtenerse principalmente de la parte posterior de la cresta ilíaca porque proporciona una gran reserva de hueso. Otras fuentes son el tubérculo de Gerdy de la tuberosidad lateral de la tibia y la parte distal del radio (**Finkemeier, 2002; Baar, 2006; Nandi, 2010**).

El autoinjerto esponjoso o trabecular es más osteogénico que el cortical ya que presenta mayor cantidad de células osteoprogenitoras (**Figura 22**). Sin embargo, hay que destacar que solo sobrevivirán las células que se encuentren a menos de 300um de una fuente de aporte sanguíneo, mientras que todas las demás morirán antes de que les lleguen los nutrientes necesarios por difusión (**Vargas, 2011**).

Debido a que sólo los osteoblastos y las células del revestimiento endosteal de la superficie del injerto sobreviven al trasplante, este actúa principalmente como un osteoconductor lo cual brinda un soporte efectivo para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y la filtración de nuevos osteoblastos y precursores osteoblásticos dentro del injerto. Los factores osteoinductivos (proteínas morfogenéticas óseas) son liberados durante el proceso de resorción del injerto.

Este injerto es un buen contribuidor al llenado del defecto óseo, sin embargo, no provee un soporte estructural sustancial inmediato porque, a pesar de que se incorpora rápidamente, sólo alcanza la fuerza equivalente a un autoinjerto cortical después de 6 a 12 meses (**Baar, 2006**). Siendo una excelente opción para aquellos casos en los que no se requiera inmediata estructura integral del injerto (**Finkemeier, 2002; Nandi, 2010**).

b) Autoinjerto cortical

El autoinjerto cortical tiene poca o nula capacidad osteoinductora, siendo su mecanismo de cicatrización fundamentalmente por osteoconducción. Sin embargo, los osteoblastos que sobreviven al trasplante también le otorgan la capacidad osteogénica. Además puede actuar como barrera para la invasión del tejido blando, comportándose de manera similar a una membrana microporosa usada para la regeneración ósea guiada y proveen un excelente soporte estructural a la zona receptora (**Finkemeier, 2002; Nandi, 2010; Vargas, 2011**).

Para obtener este injerto se recurre a zonas como peroné, costillas y cresta ilíaca, pudiendo ser trasplantados con o sin su pedículo vascular (**Finkemeier, 2002; Nandi, 2010**).

El autoinjerto cortical no vascularizado proporciona una inmediata estructura de soporte, pero durante las 6 semanas posteriores al trasplante se vuelve más débil que el autoinjerto cortical vascularizado, como resultado de la reabsorción y la lenta revascularización (**Finkemeier, 2002**). Entre los 6 a 12 meses sólo hay una pequeña diferencia en la fuerza interna del injerto entre ambos (vascularizado y no vascularizado).

Por su parte, el autoinjerto cortical vascularizado cicatriza rápidamente y la interfase hueso antiguo e injerto, así como el proceso de remodelación, es similar al hueso normal. Por el contrario el injerto cortical no vascularizado no experimenta un proceso de reabsorción y revascularización de ahí que tiene una resistencia superior durante las primeras 6 semanas. A pesar de su dureza inicial, los injertos corticales deben ser soportados por una fijación interna o externa para protegerlos de la fractura.

c) Autoinjerto cortico-esponjoso

Es una combinación de los anteriores y es muy útil para la reconstrucción anatómica ya que se puede adaptar contorneándolo al lecho receptor. Se debe colocar con la porción trabecular orientada hacia el huésped y la cortical hacia la superficie externa (**Finkemeier, 2002; Nandi, 2010**).

d) Autoinjerto de médula ósea

El autoinjerto de médula ósea se obtiene aspirando volúmenes de 100 a 150 ml de la porción posterior del ala ilíaca y puede ser inyectada en una fractura para estimular la cicatrización. Estas inyecciones de autoinjerto medular facilitan un injerto osteogénico con una potencial capacidad osteoinductiva, gracias a las citoquinas y los factores de crecimiento secretadas por las células trasplantadas (**Finkemeier, 2002; Nandi, 2010**).

Esta técnica de regeneración ósea tiene un inconveniente debido a la tendencia a la migración del material inyectado en la zona de fractura. Diversos autores como Ohgushi y Connolly (**Finkemeier, 2002**) han estudiado el efecto de injertos compuestos a base de otro sustituto

óseo e injerto de medula ósea, siendo la matriz de hueso desmineralizado un excelente portador de médula ósea, debido a su propiedad osteoconductora y osteoinductora.

A pesar de lo comentado, el injerto de médula ósea autóloga también tiene algunas ventajas (**Finkemeier, 2002; Nandi, 2010**):

- Es un procedimiento menos invasivo.
- Su técnica es relativamente simple.
- Puede utilizarse como un procedimiento extrahospitalario con un adecuado coste-beneficio.
- Perjudica menos a la zona donante si lo comparamos con autoinjertos obtenidos de la cresta ilíaca u otras partes del cuerpo.

1.10.1.3. Presentaciones del autoinjerto

Se pueden utilizar autoinjertos en bloque de cortical (corticales o cortico-esponjosos) o autoinjerto esponjoso particulado (**Keating, 2001; Deatherage, 2010**). Los injertos en bloque deben ser fijados con tornillos de osteosíntesis (**Baladrón, 2001**).

Los autoinjertos esponjosos particulados trasplantan una alta densidad de células osteocompetentes. Sin embargo, debido a su consistencia, precisan tener una adecuada retención en la cavidad ósea donde se coloquen. En caso contrario pueden precisar de una malla de titanio o una membrana y una adecuada cobertura por el periostio del colgajo de las partes blandas. Si el injerto se compacta cuidadosamente en la cavidad aumenta la densidad celular y la cantidad de hueso neoformado. Una vez consolidado el injerto, estas reconstrucciones resultan muy aceptables estéticamente y funcionalmente, permitiendo incluso la inserción de implantes osteointegrados. Un buen número de problemas clínicos se pueden solucionar también de forma sencilla empleando pequeñas o moderadas cantidades de hueso para pequeñas cavidades con injertos procedente de raspadores (**Keating, 2001; Deatherage, 2010**).

1.10.1.4. Ventajas del autoinjerto

(**Mellonig, 1992; Finkemeier, 2002; Devecioglu, 2004; Baar, 2006; Haddad, 2006; Tudor, 2008; Nandi, 2010; Soares, 2011; Vargas, 2011**)

- Tiene todos los mecanismos de regeneración ósea (osteoconducción, osteoinducción, osteointegración y osteogénesis).

- Es el más biocompatible ya que no introduce en la cavidad ningún antígeno extraño. Estas propiedades (no ser ni alergénico, ni patogénico) constituyen precisamente el argumento de mayor peso para su uso.
- Es totalmente histocompatible.
- No hay riesgo de transmisión de enfermedades.
- Es el injerto que está en mejores condiciones para soportar las fuerzas de la masticación, prótesis o fuerzas musculares y el que mejor se adecúa al contorno óseo.
- Tiene estabilidad en el tiempo.

1.10.1.5. Inconvenientes del autoinjerto

(Mellonig, 1992; Finkemeier, 2002; Devecioglu, 2004; Baar, 2006; Haddad, 2006; Tudor, 2008; Nandi, 2010; Soares, 2011; Vargas, 2011)

- La obtención del autoinjerto está asociado con un rango de complicaciones entre 8.6% y 20.6%.
- La zona donante Intraoral no siempre es suficiente en aquellos casos de grandes defectos óseos.
- No está carente de riesgos como las infecciones, sangrado, dolor, hinchazón, daños a las raíces dentales adyacentes al sitio de la zona donante o alteraciones visibles de la región mandibular después de la extracción de hueso autógeno.
- Prolongado tiempo operatorio.
- Morbilidad de la zona donante.
- Reabsorción ósea durante la cicatrización.
- Alta tasa de reabsorción, que lleva a la disminución del volumen del reborde residual de hasta un 50% después de 6 meses.

1.10.2. HUESO HOMÓLOGO O ALÓGENO (ALOINJERTO)

Origen	Capacidad	Inconvenientes
Donante de misma especie	Osteogénica-Osteoconductiva	Transmisión de enfermedades

Se trata de una alternativa al hueso autólogo ya que tienen una amplia disponibilidad y no existe la necesidad de disponer de un segundo campo quirúrgico. La efectividad del injerto es debida a las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y otras proteínas no colágenas que tienen la capacidad de inducir la neoformación ósea mediante la diferenciación de las células mesenquimales a condroblastos, que formarán un cartílago que finalmente será osificado (**Urist, 1965; Mattout, 2007**).

Cuando se comenzó a utilizar el aloinjerto como sustituto del hueso autólogo, se defendió su uso por su buena capacidad osteoinductora y osteoconductora (**Tuli, 1978; Gupta, 1982**), pero la capacidad osteoinductiva de los preparados de DFDBA resulta controvertida. Algunos autores defienden que el DFDBA sí posee esta característica (**Mellonig, 1981; Marinak, 1989; Boyan, 2006**), pero para la mayoría sólo posee capacidad osteoconductora (**Becker, 1994; Becker, 1995; Piatelli, 1996; Brugnami, 1999; Paul, 2001; Klepp, 2004**). Estas opiniones podrían estar condicionadas debido a las grandes diferencias que existen entre los distintos preparados debido a los procesos de obtención de los diferentes bancos de huesos (**Marinak, 1989; Schwartz, 1996**).

La capacidad osteoinductora depende de la cantidad de BMP que se conserven en la matriz ósea, que siempre será menor que en el hueso fresco (**Schwartz, 1996**), y aunque ésta no sufre variación por el diferente sexo de los donantes (**Schwartz, 1998**), sí disminuye con el incremento de edad de los mismos (**Boyan, 2006**). No obstante, la remineralización del hueso neoformado también va a depender de la edad del paciente objeto de regeneración, ya que los jóvenes poseen mayores concentraciones de calcio y fósforo (**Carnes, 1999**).

1.10.2.1. Fuentes de obtención del aloinjerto

El hueso liofilizado es suministrado por bancos de tejidos que ofrecen el preparado comercial en una presentación mineralizada, FDBA (aloinjerto de hueso deshidratado congelado) y otra desmineralizada DFDBA (aloinjerto de hueso deshidratado congelado desmineralizado) procedente de donantes de la misma especie pero genéticamente diferentes.

Aunque entre ambas preparaciones no hay diferencias significativas en cuanto a sus resultados en regeneración ósea (**Cammack, 2005**), este hecho determina que su eficacia varía en función del lecho receptor que se vaya a regenerar. Por ejemplo, DFDBA es más efectivo en la regeneración de tipo endocondral (**Mellonig, 1981**), como se ha demostrado en mandíbula (**Piatelli, 1996; Yukna, 2005**), mientras que FDBA es más efectivo en la regeneración de tipo intramembranosa (**Cammack, 2005, Yukna, 2005**) como la que se ha demostrado en cráneo (**Mellonig, 1981**).

La necesidad de obtener injertos seguros desde el punto de vista biológico y bacteriológico hace que el desarrollo de un banco de huesos y tejidos sea un proceso complejo y sometido a rigurosos controles legales y técnicos (**Baar, 2006**). La conservación de los aloinjertos dentro de los bancos de huesos puede efectuarse mediante congelación, sin ninguna esterilización adicional, o pueden ser sometidos a diversos procesos de esterilización como

radiación gamma, óxido de etileno y autoclavado, para después ser conservados mediante la congelación o la liofilización, ya que los procesos de selección del donante han demostrado no ser suficientes para la exclusión de los donantes infecciosos (**Ceballos, 2006**).

Hoy en día las normas respecto al procesamiento, esterilización y conservación están basadas en las recomendaciones de la *American Association of Tissue Banks* (**Committee on Research, Science and Therapy of the American Academy of Periodontology, 2001; Baar, 2006**).

Las preparaciones comerciales incluyen partículas de diferentes tamaños y formas que se conservarán dentro del hueso neoformado de humanos aproximadamente 6 meses (**Schwartz, 1996; Brugnami, 1999**). Esto es debido a que la reabsorción de DFDBA se realiza por parte de los macrófagos en lugar de los osteoclastos (**Mattout, 2007**). No obstante, a partir de los 4 años la mayoría de las partículas de DFDBA se han reabsorbido por completo y han sido sustituidas por nuevo hueso (**Simion, 1996**).

1.10.2.2. Esterilización de los aloinjertos

Todos estos procesos han demostrado que pueden ser efectivos para la erradicación de bacterias, hongos y virus, para que de esta forma los aloinjertos se puedan utilizar en forma segura en la clínica (**Vicario, 2003; Ceballos, 2006**). Sin embargo, podrían interferir en las propiedades mecánicas y biológicas del injerto (**Bostrom, 2005**).

a) Radiación

Los rayos gamma eliminan eficazmente el riesgo de contaminación bacteriana y hepatitis pero son menos eficaces en la destrucción del VIH. Ha demostrado tener efectos deletéreos sobre las propiedades mecánicas y biológicas de los aloinjertos, de forma más significativa sobre los corticales que sobre los esponjosos (**Vicario, 2003; Bostrom, 2005; Baar, 2006; Ceballos, 2006**).

b) Óxido de etileno

Actúa mediante la inactivación química de los microorganismos, incluyendo el VIH, y es considerado mejor esterilizador que la radiación gamma para la descontaminación superficial. Sin embargo, su uso es controvertido y excepcional por la persistencia de gas residual en el tejido implantado. Este causa toxicidad y potencial oncogenicidad para el receptor y dificulta la capacidad osteoconductora y osteoinductiva de los

aloinjertos tratados de este modo (**Vicario, 2003; Bostrom, 2005; Baar, 2006; Ceballos, 2006**).

c) Autoclave

Debido a las limitaciones expresadas para los métodos de esterilización anteriores, se han desarrollado otras líneas de investigación como el tratamiento con calor de los aloinjertos cuyos estudios han demostrado que los aloinjertos autoclavados tienen la capacidad de inducir la formación ósea (**Vicario, 2003**).

c.1. Ventajas del aloinjerto autoclavado

- La alta sensibilidad del VIH y otros virus a las altas temperaturas.
- La facilidad de empleo, que no requiere de complejas instalaciones como en el caso de la radiación gamma.
- La posibilidad de mantener las inserciones tendinosas y musculares.
- La posibilidad de emplear de forma segura piezas con riesgo de infección por VIH y VHC.

c.2. Inconvenientes del aloinjerto autoclavado

- La ausencia de consenso sobre cuál es el mejor protocolo de tratamiento a emplear. Así, la mayor parte de publicaciones hacen referencia a tratamientos de unos 135°C entre unos 10 y 30 minutos. Sin embargo, otros autores prefieren el tratamiento de las piezas con temperaturas más bajas y que oscilan entre los 60 a 80°C, habiendo demostrado que estas temperaturas mantienen la capacidad osteoinductiva y que no se afectan seriamente ni la revascularización ni la neoformación ósea.
- La pérdida de propiedades mecánicas tras la esterilización. De hecho, cuando se han estudiado propiedades como la resistencia al máximo estrés, el módulo de compresión, la rigidez del injerto o la energía de fracaso se han recogido pérdidas de estas propiedades (**Vicario, 2003; Bostrom, 2005; Baar, 2006; Ceballos, 2006**).

1.10.2.3. Conservación de los aloinjertos

a) Congelación

La hipotermia es el método más sencillo para enlentecer la actividad enzimática de las colagenasas y proteasas, lo que permite disminuir la inmunogenicidad de los aloinjertos. Es el proceso más utilizado para almacenar aloinjertos en los bancos de tejidos y consiste en la conservación de las piezas óseas a temperaturas que oscilan entre - 20 y - 190°C. Sin embargo, con este método de almacenamiento el tejido óseo sólo se puede mantener por un tiempo limitado, dado que no evita el daño celular producido por el frío al ser incapaz de detener los fenómenos enzimáticos celulares.

b) Criopreservación

Método de congelación gradual que emplea sustancias crioprotectoras como el dimetilsulfóxido (DMSO) o el glicerol. Los crioprotectores tienen como objetivos evitar que las células lleguen al volumen mínimo crítico, reducir el riesgo de cristalización intracelular, modificar la naturaleza del gel extracelular y evitar las híper concentraciones salinas intracelulares.

Se utiliza especialmente para conservar piezas óseas con cartílago, dado que los condrocitos sobreviven a este proceso. Existen diferentes curvas de criopreservación adecuadas para los variados tipos de tejido que se requiere conservar.

c) Liofilización

Esta técnica se utiliza para conservar aloinjertos y xenoinjertos a temperatura ambiente durante largos períodos. Sin embargo, presenta como inconvenientes la disminución de la resistencia mecánica de los tejidos y la disminución o pérdida de su capacidad osteoinductiva cuando han sido esterilizados con radiaciones.

Consiste en la deshidratación de tejidos previamente congelados al vacío, de manera que el agua, que ha sido convertida en hielo, pasa directamente al gaseoso, sin fase de vapor, quedando una cantidad de agua residual que oscila entre un 5.0% y un 8.0%.

Los cambios inducidos por la liofilización se deben al efecto de la congelación, que produce necrosis celular para disminuir la inmunogenicidad y hace que no sean osteogénicos.

1.10.2.4. Tipos de Aloinjertos según su estructura

Los aloinjertos se clasifican según su estructura en: matriz de hueso desmineralizado, esponjoso o triturado morsealizado, osteocondral y corticales.

a) Matriz de hueso desmineralizado

La matriz ósea desmineralizada liofilizada (*freeze-dried*), se encuentra disponible en varias presentaciones: polvo, gránulos, gel o pasta (**Finkemeier, 2002**) bajo los nombres comerciales Grafton DBM, DynaGraft, OrthoBlast, Osteofil, Opteform y DBX.

Actúa como osteoconductor y posible osteoinductor y, aunque no ofrece soporte estructural, se revasculariza rápidamente lo cual facilita su uso en combinación con el injerto autólogo (**Finkemeier, 2002; Nandi, 2010**).

Su actividad biológica se le atribuye a las proteínas y factores de crecimiento óseo presentes en la matriz extracelular. La matriz ósea desmineralizada puede también aumentar y expandir los injertos de hueso autólogo esponjoso cuando la fuente de hueso autólogo es limitada o el defecto es muy largo (**Mellonig, 1992; Finkemeier, 2002; Nandi, 2010**).

b) Esponjoso o triturado morsealizado

La mayoría de injertos suelen preservarse por liofilización (*freeze-drying*) y se utilizan para regenerar grandes defectos óseos cuando la cantidad de hueso autólogo es limitada, porque tienen capacidad osteoconductora y proporcionan soporte mecánico (**Finkemeier, 2002; Nandi, 2010**).

c) Osteocondrales y corticales

Se utilizan para la reconstrucción de grandes defectos óseos y se obtienen de la cresta ilíaca, las costillas, el fémur, la tibia y el peroné. Están disponibles como huesos completos o segmentos unidos, son osteoconductores por excelencia y proveen una inmediata estructura de soporte. Son procesados por congelación o liofilización. Los congelados mantienen sus propiedades y pueden ser implantados inmediatamente después de su descongelación (**Finkemeier, 2002; Nandi, 2010**).

1.10.2.5. Tipos de Aloinjertos según su conservación

a) Hueso fresco congelado

Su empleo está limitado a los injertos osteocondrales porque provocan una intensa reacción inmunológica en el huésped que puede desembocar en el rechazo del aloinjerto y no suelen compensar la teórica capacidad osteoinductiva, osteoconductiva y osteogénica (Vicario, 2003).

b) Hueso deshidratado congelado FDBA

Es hueso humano desprovisto del componente orgánico y debidamente conservado. Se suministra como hueso esponjoso o como cortical, tanto en forma de gránulos como de bloques. Al conservar el diámetro de los canalículos puede desarrollarse vascularización a través de la arquitectura esponjosa, seguida de la proliferación de fibras de colágeno y osteoblastos con la consecuente formación de tejido osteoide.

Un estudio comparativo entre este hueso y el hueso desmineralizado (DFDBA) no encontró diferencia estadística ni significativa entre ambos materiales, siendo el porcentaje de formación de nuevo hueso de un 41% aproximadamente (Solís, 2009).

c) Hueso deshidratado congelado desmineralizado DFDBA

En este caso sólo se obtiene la parte orgánica del hueso intentando aprovechar el probable efecto osteoinductivo que las proteínas morfogenéticas presentes puedan ejercer sobre el hueso del receptor. Se ha demostrado que estos aloinjertos contienen proteínas óseas morfogenéticas (BMP), por lo que se le considera osteoinductivo y osteoconductivo, propiedades que aseguran la eficacia de este aloinjerto en aplicaciones orales.

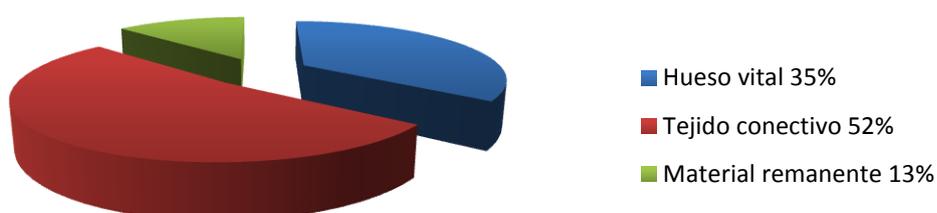


Gráfico 1. Proporción de hueso vital, tejido conectivo y material remanente en los sitios tratados con aloinjertos.

1.10.2.6. Ventajas de los Aloinjertos

(Mellonig, 1992; Keating, 2001; Froum, 2002; Isella, 2003; Vicario, 2003; Allegrini, 2008; Nandi, 2010; Reynolds, 2010)

- Biocompatibilidad.
- Elimina el sitio donante en el paciente.
- Disminuye el tiempo quirúrgico y de anestesia y se presenta menor pérdida sanguínea durante la cirugía.
- Amplia disponibilidad.
- Reducida inmunogenicidad y buena tolerancia por parte del receptor. Es de vital importancia revisar adecuadamente la historia clínica de los donantes con el fin de evitar los que tengan antecedentes de infecciones, neoplasias malignas, enfermedades óseas degenerativas, hepatitis B o C, enfermedades de transmisión sexual, SIDA y otras enfermedades que afectan la calidad del hueso y podrían afectar la salud del receptor.
- Según la *Pacific Coast Tissue Bank* conserva las BMP lo que le convierte en osteoinductor. Sin embargo, esta acción es muy leve o casi nula debido probablemente a la escasa cantidad de BMP transportadas en el aloinjerto, ya que son necesarias grandes cantidades de hueso humano para extraer pequeñas cantidades de BMP.

1.10.2.7. Inconvenientes de los Aloinjertos

(Mellonig, 1992; Keating, 2001; Vicario, 2003; Bostrom, 2005; Nandi, 2010)

- Comportamiento biológico inferior al del autoinjerto.
- Elevado coste de manutención.
- Riesgo de infección.
- Está en tela de juicio su utilización ya que después de la implantación de un aloinjerto se espera una respuesta inmune compleja que es menor debido al procesado del injerto congelado o liofilizado. Sin embargo, las propiedades fundamentales (osteoinducción) de este pueden ser alteradas.
- Transmisión de enfermedades. La mayor limitación del aloinjerto es la transmisión de enfermedades por patógenos virales y bacterias, en adición a la pérdida de las propiedades osteoinductivas, todo eso limita su uso completo en la clínica. Sin embargo, según la Asociación Americana de Bancos de Tejidos, en los últimos cinco años no se han reportado casos de transmisión de VIH en más de 2 millones de casos de aloinjertos.

- El hecho de transportar proteínas sugiere la posibilidad de actuar como antígeno, de hecho aparece a su alrededor un infiltrado inflamatorio con macrófagos y células gigantes.

1.10.3. HUESO HETERÓLOGO O XENÓGENO (XENOINJERTO)

Origen	Capacidad	Inconvenientes
Donante de distinta especie	Osteoconductiva	Transmisión de enfermedades

El xenoinjerto es un material procedente de una especie distinta a la del receptor. Actualmente hay tres fuentes disponibles de xenoinjertos utilizados como sustitutos óseos en la práctica clínica: la hidroxiapatita coralina, la ficógena (derivada de algas marinas) y la bovina (derivada del hueso bovino inorgánico desproteinizado).

Los xenoinjertos son osteoconductores, se dispone de ellos con facilidad y, a pesar de estar casi totalmente libres de riesgo de transmisión de enfermedades, esto fue cuestionado en Europa desde la aparición de la encefalopatía esponjiforme bovina.

1.10.3.1. Tipos de Xenoinjertos según su origen

1.10.3.1.1. Hidroxiapatita coralina

Es de origen orgánico y estructura porosa que se obtiene mediante el proceso de replaminaforma (réplicas de formas de vida). El armazón básico lo forma un coral escleroactiniforme del género porites, con un esqueleto formado por canales paralelos comunicados entre sí por microporos (**Sánchez, 1993**).

Las propiedades mecánicas de los injertos coralinos son más parecidas a las del hueso esponjoso que a las del hueso cortical debido a su porosidad y a su interconexión entre poros. A menor porosidad del material coralino, mayor resistencia mecánica del mismo, por lo que se puede seleccionar el material coralino más adecuado para determinadas aplicaciones clínicas (**Shors, 1999**).

En un estudio se evaluó la eficacia del osteocoral como material de injerto en el tratamiento de bolsas infraóseas de dientes unirradiculares (**Hernández-Alemán, 1999**). Se realizaron nueve injertos con hidroxiapatita y otros nueve con osteocoral y se hicieron las radiografías catorce días, tres meses y seis meses después de la intervención. El análisis final de los resultados mostró una disminución estadísticamente significativa en el índice gingival, profundidad de la bolsa al sondaje y movilidad dentaria por ambos

materiales. No se observaron diferencias entre los materiales para este tamaño de muestra, no hubo reacciones adversas y se logró la permanencia del injerto de osteocoral, por lo que se consideró efectivo el tratamiento.

Se han realizado intentos de reforzar las cerámicas coralinas mediante la elaboración de compuestos con polímeros reabsorbibles como el ácido poliláctico pero se ha comprobado que el polímero reabsorbible ocluye la interconexión entre poros, con lo que la proliferación vascular es muy inferior, consiguiéndose una menor formación ósea. Sin embargo, las cerámicas coralinas disminuyen la acidez local durante la degradación de los polímeros reabsorbibles, amortiguando los efectos locales de la misma (Li, 1996).

1.10.3.1.2. Hidroxiapatita ficógena

Es un tipo de hidroxiapatita natural, microporosa y no reabsorbible derivada de algas. La arquitectura natural de las algas calcificadas (*Rhodophyceae* y *Chlorophyceae*) presenta una superficie muy parecida a la del hueso, teniendo afinidad por las proteínas y los factores de crecimiento de la matriz ósea.

La integración ósea y la proliferación de hueso sobre la superficie de los gránulos de hidroxiapatita ficógena se explica porque el patrón de mineralización en algas y hueso es muy parecido. Las propiedades físico-químicas de este tipo de hidroxiapatita son casi idénticas a las del hueso, debido a su gran área superficial, al tamaño del cristal y a su contenido en carbonato (Kasperk, 1990).

1.10.3.1.3. Hidroxiapatita bovina

Es el xenoinjerto más utilizado en Implantología (Allegrini, 2008) y los primeros estudios datan de los años 50 del siglo pasado. Su estructura macroscópica, una vez libre de toda sustancia orgánica, es muy parecida a la matriz ósea humana y, según algunos autores, su utilización queda limitada al relleno de defectos óseos dado que su resistencia mecánica es baja, debiendo colocarse siempre en ausencia de infección local y en un lecho de hueso esponjoso bien vascularizado (Martínez-González, 1997).

La eficacia del empleo de la hidroxiapatita bovina junto con la colocación de implantes, ha quedado demostrada en numerosos estudios tanto experimentales (Berglundh, 1997), como clínicos (Van Steenberghe, 2000).

Al analizar el porcentaje de hueso neoforado tras un injerto con hidroxiapatita bovina se ha observado que aumenta significativamente al mezclar la hidroxiapatita con hueso del receptor, por lo que esta combinación es recomendable (**Araya, 2006**).

Hoy en día este biomaterial está desprovisto de inmunogenicidad ya que se somete a unos procedimientos pirolíticos que eliminan todos sus elementos proteicos y celulares que habitualmente ocupan los espacios intertrabeculares del hueso (**Rocha, 2011**).

1.10.3.1.3.1. Presentaciones comerciales del hueso bovino

- Hueso de Kiel (Surgibone®)

Apareció en los años 50, se prepara por peroxidación de las proteínas del hueso de ternera. Es osteoconductor y reabsorbible pudiéndose reesterilizar, pero su uso ha caído en la actualidad (**Nandi, 2010**).

- Unilab Surgibone®

Es la copia americana del hueso Kiel. La desnaturalización de las proteínas es también por peroxidación siguiendo las normas del F.D.A (*Food and Drug Administration*). Es osteoconductor, reabsorbible y no se recomienda la reesterilización.

- Laddec®

Contiene colágeno tipo I, al que se le atribuye el carácter inductor del material. Está tratado para eliminar los elementos no óseos como las células sanguíneas, las proteínas, la médula hematopoyética y la grasa realizando así una purificación de la matriz ósea de colágeno mineralizado.

- GenOx Inorg Esponjoso®

Tiene estructura macro y microscópica similar al hueso humano que, acompañado de su elevado grado de pureza y presencia de partículas entrelazadas, resulta en un material con gran potencial osteoconductor (**Barbosa, 2003**).

- GenOx Org Esponjoso®

No contiene BMP dado el tratamiento bioquímico del proceso de producción. Sin embargo es un excelente osteoconductor debido a su elevada porosidad (**Gerbi, 2005**).

- **GenOx Org Cortical[®]**

Posee un reducido aunque significativo potencial osteoinductor por su capacidad para liberar BMP, que se mantienen intactas durante el proceso de producción del material. Este material permite la penetración de los vasos sanguíneos debido a su porosidad (**Gerbi, 2005**).

- **Bio-Oss[®]**

Es uno de los xenoinjertos más utilizados y se obtiene mediante métodos químicos a partir de hueso cortical o esponjoso de origen bovino. La matriz mineral remanente es similar al hueso humano en términos de composición química, morfología y ultraestructura (**Araya, 2006**).

Se considera un material biocompatible ya que se ha demostrado histológicamente que posee un contacto íntimo de un 36,7% con la superficie del hueso adyacente. Su efectividad y biocompatibilidad está bien documentada, tanto en estudios en animales de experimentación como humanos. También se le atribuye la capacidad osteoconductor debido a que actúa como una malla que ayuda a la formación de hueso nuevo (**López, 1992; Rocha, 2011**). Además es biorreabsorbible y no provoca efecto inmunógeno (**Araya, 2006**).

Comercialmente (Geistlich Pharma AG) se presenta en granulado (esponjoso o de cortical) y en bloques de esponjoso, con un tamaño de cristales de 10nm. El hueso bovino obtenido es sometido a una calcinación (800 – 1200°C) con lo cual se produce una ceramización de los cristales de hidroxiapatita, lo que determinaría un aumento en el tiempo de reabsorción total de 4 años o más. Además presenta tres variedades, Bio-Oss Spongiosa Small[®], Bio-Oss Spongiosa Large[®] y Bio-Oss Collagen[®] (**Araya, 2006**).

Estudios realizados en pacientes con hidroxiapatita bovina como material de relleno maxilar, demuestran un porcentaje de éxito de los implantes mayor del 98% después de cuatro años, con porcentajes de hueso formado similares entre las zonas injertadas y las no injertadas a los doce meses (**Valentini, 1997**).

Prácticamente se obtuvo el mismo porcentaje de éxito (97%) en otro estudio (**Norton, 2003**) que consistió en rellenar los defectos alveolares con

Bio-Oss[®] en quince pacientes a los que posteriormente se le colocaron implantes. Cuando se mezcla con hueso autógeno (**Hising, 2001**) en casos de atrofia alveolar severa, sobrevivieron el 80,5% de los implantes colocados entre doce y ciento trece meses, que fue el tiempo que duró el estudio.

Respecto a su eficacia en las elevaciones de seno maxilar, los autores de un trabajo (**Yildirim, 2001**) mezclaron Bio-Oss[®] con injerto de hueso autólogo procedente de la tuberosidad, la zona retromolar y la sínfisis mentoniana y, tras siete meses y la colocación de treinta y seis implantes, los análisis histológicos mostraron que el biomaterial se encontraba perfectamente integrado en el hueso neoformado.

Para el relleno de alveolos postextracción previa a la colocación de implantes, su eficacia es aún mayor combinado con una membrana reabsorbible, en comparación con los casos donde solamente se colocó una membrana en ausencia del biomaterial (**Cornelini, 2004**).

En un estudio clínico prospectivo con 15 seres humanos sistémicamente sanos se siguió un protocolo de preservación alveolar post exodoncia utilizando xenoinjertos de origen bovino (Bio-Oss[®], Geistlich, Suiza) (**Artzi, 2000**). Los hallazgos histológicos de las muestras obtenidas después de 9 meses de haber posicionado el injerto en el alveolo post exodoncia con el uso de trefinas de 2.5 mm de diámetro y de 7 mm de longitud, previo a la colocación de un implante en la zona preservada, presentaban en promedio un porcentaje de neoformación ósea equivalente al 46%, con presencia de tejido conectivo equivalente al 22.9% y partículas del material de injerto óseo que correspondían al 30.8% (**Artzi, 2000**).

Dentro del protocolo quirúrgico reportado por los autores, se describe el cierre primario del sitio injertado con una técnica de colgajo rotacional. El análisis histológico incluyó la evaluación de los diferentes componentes de la matriz extracelular con coloraciones de azul de alcian, ácido peryódico de Schiff, tricrómico de Mallory y rojo picrosirius para análisis específico del tejido conectivo (**Artzi, 2000**).

Los resultados obtenidos a través del análisis de microfotografías, promediados con análisis estadístico ANOVA, demostraron un promedio de neoformación ósea en la zona más coronal de los alveolos injertados equivalente al 17.13%, con una proporción de hueso lamelar: hueso trabecular inmaduro de 1:12.9. En la zona media de las muestras obtenidas, equivalente al tercio medio del alveolo injertado, se encontró un promedio de 48.27% de hueso nuevo, con una proporción de hueso lamelar: hueso trabecular inmaduro de 1:3.8 mientras que en la zona más apical del injerto

se encontró un 63.87% de hueso neoformado con una distribución más cercana entre hueso lamelar y hueso trabecular inmaduro: 1:1.7 (**Artzi, 2000**).

Los autores encontraron contacto directo entre las partículas del xenoinjerto y las células óseas y el hueso neoformado en las muestras analizadas, con aposición de osteoide en algunas zonas recubriendo las partículas no reabsorbidas y propusieron que el tejido óseo reticular inmaduro que recubre las partículas estériles del material de injerto tardaría en madurar precisamente como resultado del contacto directo con las partículas que no tienen efecto osteogénico (**Artzi, 2000**).

Después de 9 meses de haber realizado el procedimiento quirúrgico, las partículas del xenoinjerto aún estaban presentes en el sitio quirúrgico sin mostrar signos de reabsorción; en los cortes histológicos no fueron identificadas células correspondientes a osteoclastos, por lo que se plantea una degradación parcial de las partículas del injerto más que una verdadera reabsorción de las mismas (**Artzi, 2000**).

Un año después, otro estudio similar corroboró estos resultados (**Zitzmann, 2001**), confirmando la capacidad osteoconductiva de Bio-Oss[®]. Los autores encontraron partículas presentes 6 meses después de haber realizado un procedimiento de aumento horizontal de reborde alveolar, utilizando membranas reabsorbibles, en contacto con el hueso neoformado y con células óseas (**Zitzmann, 2001**). Este último estudio concluye que, a pesar de la pequeña muestra incluida correspondiente a 6 seres humanos, el proceso de remodelado óseo se da de manera similar tanto en el tejido óseo del huésped como en el material de injerto utilizado (**Zitzmann, 2001**).

En 2004, presentaron un estudio prospectivo en el modelo animal para evaluar la capacidad osteoinductora y osteoconductora del Bio-Oss[®], (Geistlich, Suiza), observando el comportamiento celular en defectos de 3.0 mm X 0.7 mm creados en el fémur de 30 ratas Wistar adultas (**Tapety, 2004**). El grupo experimental fue injertado con el xenoinjerto, mientras que el grupo control, correspondió al miembro contralateral del mismo animal, no lo fue. El periostio de la zona estudiada fue eliminado para permitir migración de células óseas hacia el defecto a partir de la médula ósea del fondo del defecto.

Los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras histológicas de los sitios evaluados el día 1, 3, 5, 7 y 14. A las muestras les fueron aplicados anticuerpos anti fosfatasa alcalina y anti osteocalcina para determinar, bajo microscopia electrónica, la activación de células formadoras de hueso (**Tapety, 2004**). Los resultados obtenidos por los

autores demostraron que en el modelo animal, el Bio-Oss[®] induce la aposición de nuevo hueso sobre su superficie, promoviendo la regeneración del tejido óseo en defectos creados clínicamente, con evidencia de reabsorción de sus partículas a través de la acción de los osteoclastos (**Tapety, 2004**).

Las pruebas inmunohistoquímicas desarrolladas en las muestras obtenidas demostraron que durante las fases iniciales de regeneración ósea, el Bio-Oss[®] puede actuar promoviendo la diferenciación osteogénica del linaje osteoblástico al revelar inmunoreactividad leve a la fosfatasa alcalina y al observar osteoblastos ubicados sobre la superficie de las partículas de Bio-Oss[®], secretando fibras de colágeno y expresando activación débil de osteocalcina, la cual se hallaba depositada sobre la superficie de las partículas del xenoinjerto (**Tapety, 2004**).

Por otra parte, Amerio y colaboradores en 2010, realizando pruebas in vitro, determinaron que el Bio-Oss[®] no induce expresión de proteínas ni citoquinas proinflamatorias en los osteoblastos que entran en contacto con sus partículas, como pueden ser la IL-6, el TNF- α o la sialoproteína ósea, lo cual corroboraría su bajo potencial antigénico y lo llevaría, según los autores, a ser considerado como un material de injerto seguro aún en pacientes con enfermedades autoinmunes como artritis reumatoidea y psoriasis artropática, situaciones en las cuales la reabsorción ósea se convierte en una complicación común (**Amerio, 2010**).

Autor	Tipo de estudio	Materiales	Seguimiento	Dientes tratados
Artzi, 2001	Humanos	Bio-Oss [®]	9 meses	-
Norton, 2003	Humanos	Bio-Oss [®]	4 meses	Unirradiculares Multirradiculares
Araujo, 2008	Perros Mongrel	Bio-Oss Collagen [®]	3 meses	Premolares inferiores
Fickl, 2008	Perros Beagle	Bio-Oss Collagen [®]	4 meses	Premolares inferiores
Araujo y Lindhe, 2009	Perros Beagle	Bio-Oss Collagen [®]	6 meses	Premolares inferiores
Fickl, 2009	Perros Beagle	Bio-Oss [®] Collagen + BioGide [®]	4 meses	Premolares inferiores
Araujo, 2010	Perros Beagle	Bio-Oss Collagen [®]	4 semanas	Premolares inferiores
Kim, 2011	Humanos	Bio-Oss [®] + Teruplug [®]	3 meses	Molares

Tabla 1. Estudios que evalúan la utilización de xenoinjertos de origen bovino.

1.10.3.1.3.2. Ventajas del hueso bovino

(Camargo, 2000; Paolantonio, 2002; Barbosa, 2003; Devecioglu, 2004; Hartman, 2004; Gerbi, 2005; Piña-Barba, 2006; Maiorana, 2011; Rocha, 2011)

- Biocompatibilidad.
- Se pueden conseguir con facilidad.
- Actúa como un andamiaje siendo su principal acción la osteoconducción. Por lo general se realiza una mezcla con hueso autólogo u homólogo ya que no presenta propiedades osteoinductivas.
- Resistente a la reabsorción ósea después de su colocación en defectos óseos. Para mejorar sus resultados se utiliza en combinación con hueso autógeno y membrana.

1.10.3.1.3.3. Inconvenientes del hueso bovino

(Camelo, 1998; Paolantonio, 2002; Barbosa, 2003; Hartman, 2004; Gerbi, 2005; Park, 2007; Delgado-Ruiz, 2011)

- Reabsorción acelerada de matrices orgánicas.
- Disminuye los riesgos de infección y las repuestas inmunológicas del huésped. Sin embargo, las posibilidades de transmisión de enfermedades no están completamente erradicadas. Aparentemente este sustituto óseo puede suscitar estímulos antigénicos suficientes para provocar una respuesta inmune en el huésped resultando en una incorporación acelerada y también resorción acelerada del injerto.
- En los últimos años se ha especulado sobre la posibilidad de que podría transmitir la encefalopatía espongiiforme bovina o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, por lo que se necesitan más estudios al respecto.



Gráfico 2. Proporción de hueso vital, tejido conectivo y material remanente en alveolos tratados con Bio-Oss®.



Gráfico 3. Proporción de componentes histológicos en alveolos tratados con Bio-Oss®.

1.11. MATERIALES ALOPLÁSTICOS (BIOMATERIALES)

Origen	Capacidad	Inconvenientes
Material inerte	Osteoconductiva	Encapsulamiento

Se trata de materiales de injerto óseo de origen sintético. Algunos ejemplos incluyen la hidroxiapatita, los cristales bioactivos y el fosfato tricálcico (Irinakis, 2007; Allegrini, 2008; Deatherage, 2010; Esposito, 2010). Los materiales de fosfato de calcio poseen características que lo convierten en un muy buen material de injerto óseo, como la similitud en la composición del tejido óseo en cuanto a su proporción mineral, la bioactividad, la osteoconductividad y la habilidad para formar una interfase fuerte con el tejido óseo del huésped (Allegrini, 2008). Sin embargo, hay estudios que afirman que, cuando son utilizados como materiales de preservación previo a la colocación de un implante y se contaminan cuando este ya se encuentra en posición, tienden a desencadenar un proceso patológico acelerado que lleva a la pérdida de la osteointegración (Deatherage, 2010).

El contenido mineral del tejido óseo natural corresponde a calcio, fosfato y un grupo OH $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, con una relación de calcio y fósforo de 1 a 1.67, situación similar a la de los injertos aloplásticos a base de fosfato de calcio (Allegrini, 2008).

Autor	Tipo de estudio	Materiales	Seguimiento	Dientes tratados
Horowitz, 2009	Humanos	Fosfato β -tricálcico	6 meses	Unirradiculares Multirradiculares
Roriz, 2009	Perros Mongrel	Cristales bioactivos: Biosilicate® Vitrovita, Brasil y Biogran® Orthovita, Pennsylvania.	12 semanas	Premolares inferiores bilaterales
Araujo, 2010	Perros Beagle	Fosfato β -tricálcico	4 semanas	Premolares inferiores bilaterales

Tabla 2. Estudios que evalúan la utilización de injertos aloplásticos.

a) Hidroxiapatita sintética

Se trata de un material de fosfato de calcio con variaciones en densidad, estructura y química superficial. Su forma particulada es ideal para preservación de alveolos a largo plazo, debido a su baja tasa de reabsorción. Cuando son implantadas en alveolos post exodoncia, las partículas del injerto se adhieren a las paredes alveolares e interactúan con las células óseas mientras que las partículas que quedan separadas de las paredes del alveolo son encapsuladas por una matriz densa de tejido conectivo fibroso.

No es el material de elección cuando se planea rehabilitar el espacio edéntulo con implantes de osteointegración, pero es muy útil para preservar la arquitectura del reborde remanente que será rehabilitado con prótesis fija ya que impide colapsos y complicaciones estéticas (**Bartee, 2001; Allegrini, 2008; Misch, 2008**).

b) Fosfato β -tricálcico

Es un material de reabsorción lenta, químicamente similar al tejido óseo, con estructura cristalina, contenido carbónico y porosidad similar a la de los xenoinjertos. Se reabsorbe principalmente por fragmentación, siguiendo un proceso de disolución físico-química (**Bartee, 2001; Araujo, 2010**).

La principal desventaja es que si se planea su utilización como material de preservación en alveolos post exodoncia, será necesario un tiempo de espera mínimo de 12 meses antes de realizar la cirugía de colocación de implantes, aunque aún después de 5 años es posible encontrar partículas del material sin reabsorberse y sin haber sido reemplazadas por hueso vital (**Bartee, 2001; Allegrini, 2008, Solís, 2009**).

Sin embargo, existe un estudio clínico prospectivo en el cual llevaron a cabo preservación de alveolos post exodoncia en dientes uni y multirradiculares en 30 pacientes adultos sistémicamente sanos con seguimiento durante seis meses (**Horowitz, 2009**). Los hallazgos reportados por los autores evidencian la preservación del 88% del volumen de reborde remanente en sentido apicocoronal y vestíbulo lingual/palatino y reabsorción casi total del material de injerto utilizado, lo cual permitió la colocación de implantes de osteointegración en los sitios injertados sin complicaciones durante el procedimiento quirúrgico (**Horowitz, 2009; Mardas, 2010**).

c) Cristales bioactivos

Se trata de materiales cerámicos obtenidos a partir de la combinación de hidroxiapatita con fosfato β -tricálcico. Está demostrado que el Bioglass[®] (US Biomaterials, Baltimore) es un material capaz de promover la formación de hueso vital en alveolos postextracción y que es osteoconductor, con un efecto positivo en la cicatrización después de un período de 6-8 semanas (**Froum, 2002**).

Su capacidad de reabsorción a largo plazo dependerá del tamaño de las partículas injertadas y estará condicionada por la actividad celular y la disolución a partir de los fluidos corporales del hospedero (**Bartee, 2001; Allegrini, 2008**).

d) Sulfato de calcio

Uno de los primeros materiales investigados como sustituto óseo fue la forma β -hemihidratada del sulfato de calcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) conocida como Yeso de París. Se trata de un biomaterial biológicamente inerte, osteoconductor, reabsorbible y altamente biocompatible (**Allegrini, 2008; Deatherage, 2010**).

Las ventajas de este material incluyen su fácil manipulación, reabsorción producida por osteoclastos y deposición de osteoide producido por osteoblastos. Como inconvenientes presenta baja estabilidad mecánica a largo y su escasa bioactividad, lo cual durante las primeras fases de cicatrización no favorece una unión química adecuada al tejido óseo (**Allegrini, 2008; Solís, 2009**).

e) Conos de hidroxiapatita

Su uso fue muy difundido en la primera mitad de los años 80 pero la dificultad para obtener cierre primario sobre los alveolos injertados y las complicaciones postoperatorias relacionadas hicieron que entraran en desuso (**Bartee, 2001**).

f) Polimetil metacrilato

Es un material poroso que fue utilizado durante los años 80 como opción para preservar alveolos post exodoncia. Se trata de una resina

acrílica hidrofílica, cuyas principales ventajas son el bajo costo, la alta manejabilidad y la baja conductividad térmica (**Allegrini, 2008**). Sin embargo, su reacción de autopolimerización exotérmica puede ocasionar una necrosis de los tejidos del huésped (**Allegrini, 2008**).

Seguimientos clínicos desarrollados hasta 30 meses después de ser injertado, demostraron presencia de partículas del material rodeadas por tejido conectivo. Además, es un material que induce la reacción de los macrófagos lo cual puede llevar a reabsorción del tejido óseo y a reacciones que involucren la participación de células gigantes (**Bartee, 2001; Allegrini, 2008**).

Biomateriales	Composición	Presentación	Propiedades	Reabsorción
Ionómero de vidrio	Ca/Al/fluorsilicato y ác. policarboxílico	Polvo	Resistencia a la compresión. Módulo de elasticidad comparable con el hueso cortical	No reabsorbibles y por tanto, no reemplazado por hueso
Fosfato β -tricálcico	Fosfato cálcico	Bloques Gránulos	Frágil. Forma porosa similar al hueso esponjoso	6-18 meses
Cementos de fosfato cálcico	Fosfato cálcico	Pasta	Buena resistencia a la compresión. Débil en distracción	Años
Óxido de aluminio	Alúmina	Bloques Gránulos	Más resistente que la hidroxiapatita	No
Sulfato cálcico	Sulfato cálcico	Polvo	Propiedades mecánicas deficientes	5-7 semanas
Cristal bioactivo Biogran [®]	Óxido de sodio, óxido de calcio, pentóxido de fósforo, dióxido de silicón	Bloques Gránulos Barras	Más resistente que la hidroxiapatita	Sí/No
Hidroxiapatita sintética (Orthomatrix HA-500)	Fosfato cálcico	Bloques Gránulos	Buena resistencia a la compresión. Frágil. Módulo de elasticidad mayor que el hueso	Forma cerámica 1-2% por año. Forma no cerámica % mayor. Orthomatrix no reabsorbible
Hidroxiapatita coralina (Interpore 200)	Fosfato cálcico	Bloques Gránulos	Estructuralmente similar al hueso esponjoso. Frágil	Prácticamente no reabsorbibles
Carbonato cálcico y fosfato cálcico (Pro-osteon 500)	Carbonato cálcico cubierto por fosfato cálcico	Bloques	Estructuralmente similar al hueso esponjoso	Carbonato: rápido Fosfato: lento
Composite polímero (Bioplant HTR)	Polimetilmetacrilato Polihidroxil-etilmetacrilato Hidróxido de carbonato cálcico	Gránulos	Poroso Matriz resistente	No

Tabla 3. Descripción de las características de diversos biomateriales.

1.12. FLAVONOIDES

1.12.1. GENERALIDADES DE LOS FLAVONOIDES

Los flavonoides constituyen el grupo más importante representando el 60% de los polifenoles. Se han identificado más de 5000 variedades de flavonoides (**Patel, 2007**) y están clasificadas de acuerdo a su estructura molecular, que consiste en dos anillos aromáticos (anillos A y B) unidos por tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado central (anillo C) (**Figura 29**) (**Ross, 2002; Manach, 2004**). Este número es tan elevado debido a las múltiples combinaciones posibles entre los grupos hidroxilo, metoxilo y glicósido con la estructura básica de benzo- γ -pirona (C₆-C₃-C₆).

Durante décadas los flavonoides han sido investigados por sus efectos de conservación ósea en relación a los déficits de estrógenos producidos por la pérdida ósea en animales de laboratorio (**Yoon, 2006; Sharan 2009; Siddiqui, 2010**). Siendo fitoestrógenos, es decir, compuestos químicos no esteroideos que se encuentran en los vegetales pero son similares a los estrógenos humanos, los flavonoides han ganado la preferencia como agentes profilácticos contra la menopausia y la pérdida ósea por carecer de los efectos adversos que comúnmente se asocian con la terapia de reemplazo de estrógeno (**Maggio, 1980; La Vecchia, 2001; Bhargavan 2009; Sharan, 2009**).

Los flavonoides se clasifican en subgrupos, según la conexión entre los anillos B y C, el estado de oxidación y los grupos funcionales del anillo C (**Beecher, 2003**). Los seis subgrupos principales son: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianinas e isoflavonas (**Figura 30**) (**Manach, 2004**). Otros subgrupos que están presentes de forma minoritaria en la dieta son: dihidroflavonoles, flavan-3,4-dioles, cumarinas, chanconas, dihidrochanconas y auronas.

El esqueleto básico de los flavonoides puede tener ciertos sustituyentes, si bien los grupos hidroxilo (OH) suelen estar en las posiciones 4',-5' y 7'. Los azúcares son muy comunes y se encuentran glicosilados en la mayoría de flavonoides. Tanto los azúcares como los grupos hidroxilo (OH), aumentan la solubilidad en agua de los flavonoides. Otros sustituyentes como los grupos metilo o unidades isopentil hacen a los flavonoides más lipófilos (**Crozier, 2009**).

Se han descrito una serie de alimentos y bebidas con alto contenido en flavonoides. Las frutas y verduras (cítricos, manzanas, uvas, cebollas, legumbres), el chocolate negro y las bebidas como el té (verde o negro) y el vino tinto, son las principales fuentes de flavonoides de la dieta (**Adamson, 1999; Benavente-García, 2007; Loke, 2008; Bhagwat, 2011**).

El consumo total de flavonoides oscila aproximadamente entre 20 mg/d (Estados Unidos, Dinamarca, Finlandia) y 70 mg/d (Holanda), aunque estos

valores no representan el total de los flavonoides ingeridos en la dieta ya que sólo se tienen en cuenta tres flavonoles y dos flavonas (**Aherne, 2002; Beecher, 2003; Manach, 2004; Crozier, 2009**). La ingesta de flavonoides excede a la de otros antioxidantes como el beta-caroteno (2-3 mg/día) y la vitamina E (7-10 mg/día), mientras que representa aproximadamente un tercio del consumo de vitamina C (70- 100 mg/día). Así pues, los flavonoides constituyen una contribución importante al potencial antioxidante de la dieta humana (**Yong, 2015**).

Los flavonoides desempeñan funciones metabólicas importantes en las plantas. Sus principales funciones son actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, y proteger frente a la acción de patógenos, predadores y frente a los daños producidos por la luz ultravioleta. Casi todos los flavonoides son pigmentos, lo que se asocia con su capacidad electrónica para captar y transferir energía, así como para atraer insectos, animales y aves polinizadoras. Además tienen un importante papel en el metabolismo del nitrógeno (**Havsteen, 2002; Taylor, 2005**).

El espectro de propiedades biológicas de estos compuestos en los seres humanos es muy variado. Funcionan como antioxidantes, antiinflamatorios, analgésicos, antivíricos, antibacterianos y antifúngicos. El consumo regular de flavonoides también se ha asociado con un menor riesgo de padecer varias enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos y cáncer.

Con respecto a la salud cardiovascular, los flavonoides pueden alterar el metabolismo de los lípidos (**Zern, 2005**), inhibir la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) (**Jeong, 2005**), reducir la formación de lesiones ateroscleróticas (**Fuhrman, 2005**), inhibir la agregación plaquetaria (**Hubbard, 2006**), disminuir la expresión de la molécula de adhesión celular vascular (**Ludwig, 2004**), mejorar la función endotelial (**Hallund, 2006**) y reducir la presión arterial (**Hodgson, 2006**).

Los flavonoides también han demostrado mejorar la función cognitiva y revertir la neurodegeneración relacionada con la edad (**Joseph, 1999**). También se les atribuyen propiedades anticancerígenas ya que son capaces de actuar sobre múltiples etapas de la carcinogénesis: inhiben el daño oxidativo del ADN, inactivan carcinógenos y enzimas responsables de la activación de los procarcinógenos (**Patel, 2007**), inducen la apoptosis de las células (**Mantena, 2006**), inhiben proliferación de células cancerosas (**Wang, 2000**) y previenen la angiogénesis, la invasión tumoral y metástasis (**Yang, 2008**).

1.12.2. FLAVONOIDES DEL CACAO

Los flavonoides del cacao tienen efectos beneficiosos para la salud porque protegen contra el estrés oxidativo y la inflamación crónica, ayudando a prevenir ciertas enfermedades cardiovasculares y el cáncer.

Las semillas de *Theobroma Cacao* son una importante fuente dietética de antioxidantes dado su elevado contenido en flavonoides, principalmente flavanoles (**Adamson, 1999**). Los flavanoles del cacao pueden presentarse en forma de monómeros, siendo los más importantes las catequinas o flavan-3-oles, y en forma de polímeros, donde las procianidinas son las más abundantes (58%). La (-)-epicatequina (**Figura 31**), que supone aproximadamente el 35% del total de los polifenoles presentes en el cacao (**Wollgast, 2000**), es la catequina más abundante.

Tanto catequinas como procianidinas del cacao se caracterizan por sus marcadas propiedades antioxidantes *in vitro*. Tal afirmación se demuestra en un estudio (**Arts, 1999**), donde se compararon las catequinas del chocolate con las del té, y que concluyó que estas últimas tenían un efecto antioxidante hasta cuatro veces menor, siendo las catequinas y sus oligómeros unidos por enlace C4→C8 las de mayor efecto (**Osakabe, 2002**).

Los polifenoles del cacao previenen del riesgo de padecer enfermedad cardiovascular, ya que son capaces de inhibir la oxidación de las LDL (**Wan, 2001; Mathur, 2002**), la activación y agregación plaquetaria (**Rein, 2000; Hermann, 2006**) e incrementar la producción de óxido nítrico en el tejido endotelial con un efecto vasodilatador (**Karim, 2000; Hermann, 2006**).

El cáncer es un ejemplo de las patologías que se relacionan con un aumento en la concentración de radicales libres en el organismo. La vulnerabilidad de las proteínas y del ADN al potencial oxidativo del organismo humano, se ha considerado un factor carcinogénico de gran importancia. Además de los carcinogénicos ambientales, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que se forman continuamente como resultado de diferentes reacciones bioquímicas, pueden causar un daño oxidativo significativo.

Diferentes estudios experimentales han revelado las propiedades de los flavonoides del cacao para inhibir el daño oxidativo sobre el ADN de la célula de algunos carcinógenos externos, mostrando así su papel protector en la prevención del cáncer (**Ohno, 2009**). Se ha observado un efecto protector de los polifenoles del cacao contra la aflatoxina B1, que es un potente mutágeno y carcinógeno, al evitar la unión de ésta y el benzo[a]pireno con el ADN. La (-)-epicatequina descrita anteriormente tiene un efecto antimutagénico sobre uno de los componentes del tabaco, ya que previene su oxidación a la forma activa que daña el ADN (**Jardine, 1999**).

A continuación se enumeran otras investigaciones sobre las propiedades de las flavonas del cacao en las diferentes etapas de la carcinogénesis.

Las procianidinas detienen el ciclo celular en la fase G2/M e inhiben el crecimiento de las células Caco-2 presentes en el cáncer de colon (**Carnesecchi, 2002**). De igual modo inhiben selectivamente la proliferación del cáncer de mama humano, mediante la desfosforilación de varias proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular (**Ramljak, 2005**), y la expresión del gen de la tirosina quinasa ErbB2 que disminuye la angiogénesis asociada a la patología tumoral (**Kenny, 2004**).

Respecto a los polifenoles del cacao, es un hecho que a la concentración más alta ensayada (0,2%), inducen la inhibición completa del crecimiento en las líneas celulares metastásicas DU145 y no metastásicas 22Rv1 del cáncer de próstata (**Jourdain, 2006**). El extracto de licor de cacao también presenta propiedades que ayudan a reducir la actividad de las enzimas de los marcadores tumorales en la hepato-carcinogénesis (**Amin, 2004**). Además disminuyen la hiperplasia de próstata a través de la reducción de los niveles de dihidrotestosterona (**Bisson, 2008**). Posteriores estudios realizados por este autor, demostraron que también reducían la incidencia de tumores de próstata si se administraban previamente a la inducción del proceso de carcinogénesis (**Bisson, 2008**).

En lo que respecta a la inflamación crónica, es un hecho que incrementa la posibilidad de aparición del cáncer debido a que origina un recambio celular continuo, estableciendo un ambiente propicio para la carcinogénesis (**Willett, 2002**). A este nivel, las procianidinas del cacao han mostrado la capacidad de modular las citoquinas involucradas en la respuesta inflamatoria aguda (**Steinberg, 2002**). Además tienen un efecto inhibitorio sobre la fosfolipasa A2, la ciclooxigenasa y lipooxigenasa, disminuyendo de esta forma los niveles de prostaglandinas, sustancias que incrementan la respuesta inflamatoria (**Wollgast, 2000**).

1.12.3. FLAVONOIDES CÍTRICOS

Los flavonoides forman parte de una familia de compuestos polifenólicos de origen natural caracterizada por una estructura benzo- γ -pirona común. Se trata de uno de los compuestos más importantes presentes en los vegetales, especialmente en el género *Citrus* (familia *Rutaceae*).

Hay cuatro tipos de flavonoides (flavanonas, flavonas, flavonoles y antocianinas, este último sólo presente en las naranjas rojas o sanguinas) que se producen en los cítricos (**Benavente-García, 2007**). En este género las flavanonas se acumulan en mayor cantidad que las flavonas. La concentración de flavonoides depende de la edad de la planta y los mayores niveles se encuentran en los tejidos que presentan elevadas divisiones celulares. Estos compuestos no sólo juegan un importante papel fisiológico y ecológico, sino

que también resultan de interés comercial debido a la multitud de aplicaciones en las industrias alimentarias y farmacéuticas.

Los flavonoides cítricos han demostrado poseer efectos inhibitorios en el crecimiento de las células HL-60 de la leucemia, con un mecanismo no tóxico (**Hirano, 1994**) que es casi equivalente a los efectos que utilizan los actuales agentes anticáncer. En estudios más recientes, los flavonoides cítricos han resultado capaces de inhibir la proliferación de las células MDAMB-435 y MCF-7 del cáncer de mama (**Manthey, 2002**). En otro estudio se examinó la capacidad antiproliferativa de 27 flavonoides cítricos por sus propiedades antiproliferativas contra tumores y líneas celulares normales. Como resultado se obtuvieron 4 flavonoides que se determinaron como activos contra las líneas celulares tumorales, incluyendo A549 del cáncer de pulmón y TGBC11TKB del cáncer de estómago, mientras que no afectaron significativamente a la proliferación de las células normales (**Kawaii, 1999**).

Flavonoides cítricos como tangeretina, nobiletina, quercetina y taxifolina tienen efectos antiproliferativos sobre las células HTB43 del carcinoma de células escamosas (**Kandaswami, 1991**). Quercetina ha demostrado su actividad antiproliferativa contra las células del meningioma (**Piantelli, 1993**) y contra las células del cáncer de colon, Caco-2 y HT-29 (**Kuo, 1996**). Diosmina, otro flavonoide cítrico con efecto vasodilatador, también ha demostrado esa actividad antiproliferativa aunque con menos eficacia que la quercetina. En roedores se ha utilizado naringenina, herperidina, neoshesperidina, tangeretina y nobiletina para inhibir la transformación neoplásica en la carcinogénesis oral (**Miller, 2008**).

Mención aparte merece la eriocitrina (**Figura 32**). Es una flavanona que se encuentra en forma glicosilada en el hidroxilo situado en el C-7. Es muy abundante en el limón y en la lima, obteniéndose de la piel de estos frutos cítricos. Las hojas de menta (*Mentha piperita L.*), constituyen también una fuente importante de polifenoles, siendo la eriocitrina (383,3 +/- 2,2 mg/g de extracto) y el ácido rosmarínico (381,2 +/- 1,9 mg/g extracto) los componentes más abundantes identificados dentro de estas hojas (**Dorman, 2009**). La menta es un remedio ampliamente conocido en la medicina tradicional que sirve para aliviar los trastornos digestivos y sus hojas se utilizan para el tratamiento de la bronquitis, diabetes, diarrea, fiebre, hipertensión, ictericia, náuseas, dolor, afecciones respiratorias e infecciones del tracto urinario (**Baliga, 2010**).

Estudios experimentales en roedores han demostrado que la menta también posee propiedades preventivas contra carcinogenicidad del shamma (mezcla de tabaco, aceites y especies) en el modelo de carcinogénesis oral sobre la mucosa yugal (**Samman, 1998**) y frente al cáncer de pulmón inducido por benzo[a]pireno (**Kumar, 2004**).

La eriocitrina posee la actividad más antioxidante de todos los flavonoides glicósidos presentes en los frutos de limón (**Tripoli, 2007**). En ratas se ha observado que suprime de forma significativa el estrés oxidativo inducido con estreptozotocina en el hígado (**Miyake, 1998**) o causado por el ejercicio físico (**Minato, 2003**).

Varios estudios realizados sobre los flavonoides presentes en los cítricos, han demostrado su capacidad para inhibir la proliferación de muchos tipos de líneas celulares cancerosas en ensayos *in vitro*. Por ejemplo, se observó que la eriocitrina y sus metabolitos secundarios producidos por la hidrólisis de una bacteria intestinal (eriodictyol, ácido 3,4-dihidroxihipocinámico y floroglucinol) (**Miyake, 1997**), inducen la apoptosis en las líneas celulares leucémicas HL-60 (**Ogata, 2000**).

En otro trabajo, se demostró que los flavonoides del limón y sus metabolitos inducen la apoptosis en la línea de células leucémicas HL-60, en dosis y tiempo dependientes (**Ogata, 2000**).

Por los datos expuestos es un hecho la acción beneficiosa de los flavonoides cítricos en múltiples vías biológicas relacionadas con el cáncer. El cáncer puede ser controlado por una gran variedad de medios, siendo los principales la supresión, el bloqueo y la transformación de las células. Los agentes de supresión pueden prevenir la formación de nuevos cánceres a través de procarcinógenos, agentes bloqueadores que impidan que los compuestos cancerígenos lleguen a los sitios críticos de iniciación, y los agentes de transformación actúan para facilitar el metabolismo de los componentes cancerígenos en compuestos menos tóxicos o para evitar que sus acciones biológicas. Los flavonoides pueden actuar en las tres formas.

Los estudios epidemiológicos y en animales sugieren que los flavonoides tienen un efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Aunque el estudio de los flavonoides data de aproximadamente unos cincuenta años, los mecanismos celulares implicados en su acción biológica todavía no son muy comprendidos. En los últimos años, los modelos experimentales han proporcionado evidencia creciente a la acción beneficiosa de los flavonoides en múltiples vías biológicas relacionadas con el cáncer (bioactivación carcinógena, señalización celular, regulación del ciclo celular, angiogénesis e inflamación). Este estudio demuestra que los factores estructurales explicarían la capacidad antioxidante, antiproliferativa y antimetastásica de los flavonoides cítricos. En este trabajo se discute la relación entre cada factor estructural y la actividad contra el cáncer de flavonoides cítricos (**Benavente-García, 2007**).

En estudios sobre diferentes líneas celulares del melanoma (**Benavente-García, 2007**), se han demostrado efectos antiproliferativos de los flavonoides cítricos contra estas células cancerosas, sin presentar efectos citotóxicos

(**Rodríguez, 2002; Martínez, 2003**). Estos resultados indican la correlación entre la estructura del flavonoide y su actividad antiproliferativa. Incidiendo en el tema, estudios preliminares en las células B16F10 y SK-MEL-1 del melanoma, utilizando varios flavonoides de origen cítrico, mostraron que la presencia del doble enlace C₂-C₃ en el anillo C junto con la función 4-oxo, fueron críticas para su actividad biológica (**Rodríguez, 2002**).

Estudios posteriores mostraron que la presencia de tres o más radicales hidroxilo en cualquiera de los anillos de la estructura del flavonoide aumentaron significativamente la actividad antiproliferativa observada en los cultivos celulares B16F10 (**Martínez, 2003**).

1.12.4. ÁCIDO ROSMARÍNICO

El ácido rosmarínico, denominado también ácido labiático, es un éster del ácido cafeico y del ácido 3, 4-dihidroxifeniláctico (**Figura 33**). Se encuentra en las hierbas de la familia de las lamiáceas, como el romero (*Rosmarinus officinalis L.*), la melisa (*Melissa officinalis*), la menta (*Mentha piperita L.*), el orégano (*Origanum vulgare L.*) y la perilla (*Perilla frutescens*).

Como flavonoide posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (**Petersen, 2003**). Varios estudios han demostrado que ejerce su efecto antiinflamatorio inhibiendo la activación del complemento (**Sahu, 1999**) y la actividad de la COX-2 (**Cheung, 2007**), que es considerada como un factor de riesgo en el desarrollo del tumor. También actúa inhibiendo las enzimas inflamatorias 5-lipooxigenasa y 12-lipooxigenasa (**Yamamoto, 1998**).

Su efecto anticancerígeno también ha quedado patente en un estudio en el que el extracto acuoso de las hojas de *Rosmarinus officinalis* inhibía de forma significativa la inducción de los papilomas de la piel en ratones albinos suizos (**Sancheti y Goyal, 2006**). Otro estudio mostró que el ácido rosmarínico presente en el extracto de perilla, reduce la carcinogénesis cutánea en ratones a través de la inhibición de la respuesta de varios mediadores inflamatorios (ICAM-1, VCAM-1, KC, MIP-2 y COX-2) y la captura de radicales de oxígeno reactivo (peróxidos lipídicos y ácido tiobarbitúrico) (**Osakabe, 2004**). Anteriores estudios documentaron que el extracto de romero inhibe la carcinogénesis inducida por 7,12-dimetil-benzo[a]antraceno en tumores mamarios en ratas Sprague-Dawley (**Singletary, 1991**) y la genotoxicidad del benzo[a]pireno en células bronquiales (**Offord, 1995**).

1.12.5. APIGENINA

La apigenina es un flavonoide natural, del grupo de las flavonas, cuya formulación química es 4',5, 7-trihydroxyflavona (**Figura 34**). Es un flavonoide de bajo peso molecular, baja toxicidad intrínseca y no mutagénico que será objeto de nuestro estudio experimental. Es prácticamente insoluble en agua, moderadamente soluble en alcohol caliente, y soluble en otros disolventes como el KOH y DMSO (**Shukla, 2010**).

Se halla en cantidades elevadas en vegetales como apio y perejil (**Manach, 2004**) y en las flores de la manzanilla (*Matricaria recutita*) (**McKay, 2006**), también está presente en numerosas plantas aromáticas como la menta, el orégano, el tomillo, el romero y la hierbabuena (**Bhagwat, 2011**).

Otra fuente de apigenina es la manzanilla o camomila (*Matricaria recutita* L., *Chamomilla recutita* L., *Matricaria chamomilla*), uno de los componentes más populares de las infusiones que ha sido utilizada tradicionalmente con propósitos medicinales y cuya bioactividad está más que comprobada. Las flores de manzanilla presentan compuestos fenólicos, principalmente los flavonoides apigenina (16,8%), quercetina (9,9%), patuletina (6,5%), luteolina (1,9%) y sus glucósidos. Sin embargo sus concentraciones pueden variar en las distintas partes de la flor. Por ejemplo, apigenina presenta unas concentraciones más elevadas en las flores liguladas (60%) (**Mann y Staba, 1986; Mulinacci, 2000**).

La manzanilla tiene propiedades antioxidantes (**Gráfico 4**) (**Dragland, 2003**), antifúngicas (**Soliman y Badeaa, 2002**), antimicrobianas y antiplaquetarias *in vitro* (**Pierre, 2005**). Los estudios experimentales en animales indican una potente acción antiinflamatoria, antimutagénica, antiespasmódica, ansiolítica y contribuye al descenso de los niveles de colesterol (**Al-Jubouri, 1990**). Sin embargo se carece de resultados concluyentes que demuestren sus propiedades sedantes en humanos. La manzanilla, en sus distintas formulaciones, se ha empleado como antiinflamatorio y antiespasmódico intestinal, o para reducir la inflamación cutánea y otros problemas dermatológicos (**Avallone, 2000; Patel, 2007**).

A la apigenina se le atribuyen propiedades sedantes, anticonvulsivantes, antiespasmódicas, analgésicas, antiinflamatorias y antisépticas en la medicina popular (**Heidari, 2009**). La flor de la pasión se ha empleado para tratar el asma, el insomnio, la enfermedad del Parkinson, la neuralgia y el herpes zóster. Esta flavona tiene, además, efectos antitumorales, ya que inhibe la proliferación celular de varias líneas celulares neoplásicas humanas, incluyendo cáncer de mama (**Yin, 2001**), colon (**Wang, 2000**), próstata (**Shukla, 2006**), piel (**Caltagirone, 2000**), tiroides (**Yin, 1999**) y leucemia (**Takahashi, 1998**). Estos efectos inhibitorios son producidos debido a que la apigenina regula la carcinogénesis en todas sus etapas.

En la fase de iniciación, es capaz de proteger el ADN de distintas células del daño causado por compuestos genotóxicos, evitando mutaciones que podrían fomentar el desarrollo de tumores. Así, es capaz de promover la quelación metálica, regular la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo de carcinógenos como el citocromo P450, eliminar radicales libres o estimular a las enzimas detoxificadoras de la fase II (**Patel, 2007**).

En la fase de promoción, inhibe o ralentiza la división celular mediante la regulación del ciclo celular y su capacidad de inducir apoptosis (**Gupta, 2001; Shukla, 2006; Shukla, 2008**). Actúa como reguladora del ciclo celular en numerosas líneas celulares, entre ellas en células de cáncer mama (**Yin, 2001; Choi, 2009**), cuello de útero (**Zheng, 2005**), colon (**Wang, 2000**), próstata (**Gupta, 2002; Shukla, 2006**) y de piel (**Lepley, 1997**). Disminuye los niveles de varias ciclinas (A, D1, 2 y B1), inactiva a las CDKs y regula positivamente a los inhibidores de las CDKs.

A esto se suma su capacidad para estabilizar la proteína p53, responsable de la activación de la proteína p21/waf, y de inducir la desfosforilación de Rb, evitando así la expresión de las ciclinas D y E relacionadas con la progresión del ciclo celular (**Figura 35**). Su actividad proapoptótica se debe a que aumenta la expresión de la proteína supresora p53, que aparece alterada con frecuencia en el cáncer, aumenta la expresión de Bax y Bak (proapoptóticas), aumenta el flujo de salida del citocromo c al citoplasma con la consiguiente activación de caspasa-9 y caspasa-3, activa la cascada de las caspasas e inhibe la ADN topoisomerasa II (**Shukla, 2008**) y disminuye la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bid (antiapoptóticas).

En la última fase de la carcinogénesis, la apigenina inhibe la angiogénesis y el proceso de metástasis (**Lee, 2011**). Se ha demostrado que también inhibe la angiogénesis en el melanoma, cáncer de mama, piel, pulmón y colon (**Wei, 1990; Caltagirone, 2000; Wang, 2000; Yin, 2001; Liu, 2005**).

Sus efectos parecen estar mediados principalmente a través de la supresión de la expresión del factor inducible por hipoxia 1- α , la ciclooxygenasa-2, la síntesis de óxido nítrico-2, la disminución del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de la lipoxigenasa (**Liang, 1999; Ramos, 2008**). Al mismo tiempo la apigenina ha demostrado tener capacidad anti-metastásica al disminuir los niveles de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) en la línea celular SCC-4 (Yang, 2008) y en la línea celular MDA-MB231 del adenocarcinoma de mama humano (**Lindenmeyer, 2001**).

Los flavonoides, poseen actividades reguladoras a nivel biológico. Dado que sus principales efectos se ejercen sobre células sanguíneas y células endoteliales a nivel microvascular, no resulta sorprendente que presenten propiedades antiinflamatorias, antitumorales y actúen como protectores a nivel cardiovascular (**Benavente-García, 2008**).

En cuanto a sus efectos a nivel óseo, numerosos estudios se han centrado en el estudio de la ipriflavona del grupo de las isoflavonas (**Sukmanskii, 2002; Minegishi, 2002; Maki, 2005; Ito, 2007**), sin embargo, se ha documentado que la apigenina posee efectos protectores sobre la pérdida ósea en ratas ovariectomizadas (**Park, 2008; Siddiqui, 2010**).

Además, diversos estudios demuestran que la apigenina actúa a nivel óseo disminuyendo la osteoclastogénesis y la función osteoclástica (**Bandyopadhyay, 2006**) y, por otra parte, incrementando la diferenciación osteoblástica (**Choi, 2007**).

Mención especial merece hablar de los biflavonoides. Tienen una aparición mucho más esporádica que los flavonoides (**Liang, 2008**) y se espera de ellos que tengan aún más capacidad antioxidante que la propia molécula de forma individual. La 8,8" Biapigenina (BA) es el resultante de la unión de dos moléculas de apigenina (**Figura 36**) que se encuentra en las piñas del *Cupressus sempervirens*, ciprés común o ciprés mediterráneo, especie arbórea de hoja perenne de la familia de las Cupresáceas.

Las piñas del ciprés mediterráneo se caracterizan por tener propiedades astringentes, hemostáticas, antisépticas, aromaterápicas, balsámicas y antiinflamatorias en la medicina popular india (**Mothana, 2011**). De todos los compuestos que se pueden obtener de las piñas del *C. sempervirens* (ciprés común), sólo la BA es capaz de inhibir la diferenciación de las células madre de médula ósea a osteoclastos y adipocitos y estimular las funciones de los osteoblastos. Por lo tanto la BA se puede considerar como un novedoso fitoquímico que previene el déficit de estrógenos producidos por la pérdida de hueso durante la menopausia, resultando incluso más potente que apigenina en la estimulación de la función de los osteoblastos dado que su capacidad antioxidante es proporcional a los residuos hidroxilo (OH) libres (**Furukawa, 2003**).

En un estudio sobre ratones ovariectomizados (**Siddiqui, 2010**), el tratamiento con BA consiguió inhibir los niveles de mRNA de los genes osteoclásticos, incluyendo la fosfatasa ácida, el receptor activador del factor nuclear RANK, el factor de necrosis tumoral alfa y la interleuquina-6. De igual modo, demostró su capacidad para estimular la producción de células madre osteoprogenitoras en la médula ósea y aumentar los niveles de mRNA de los genes osteogénicos, colágeno tipo I y proteína ósea morfogenética-2.

1.12.5.1. Efectos de la apigenina sobre el hueso

1.12.5.1.1. Actividad antiinflamatoria

Su efecto se ha demostrado en estudios *in vitro* donde se ha observado que interfiere en la adhesión de leucocitos y proteínas a las células endoteliales humanas (**Gerritsen, 1995**). De igual modo puede inhibir la interleuquina-1 (IL-1), la síntesis de prostaglandinas α inducidas, el factor de necrosis tumoral (TNF α) inducido por las interleuquinas 6 y 8 y bloquea la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales tratadas con citoquinas.

Otros estudios que también utilizan apigenina en modelos de cultivo celular han demostrado que este flavonoide tiene efectos inhibidores sobre la prostaglandina (PG) E2, la ciclooxigenasa (COX)-2 y la producción de óxido nítrico (**Liang, 1999**).

1.12.5.1.2. Remodelación ósea

La apigenina incrementa de forma significativa la proliferación y diferenciación de los osteoblastos. Estos efectos se deben a la capacidad de la apigenina para unirse a los receptores de estrógenos. Por su estructura, la apigenina se asemeja a los estrógenos, de ahí su relativa adhesión a los receptores estrogénicos tipo alfa y beta (α , β), aunque en mayor grado a los segundos. Esta preferencia para ligarse con los receptores tipo β llevará consigo una mayor actividad de transcripción de la apigenina sobre aquellos tejidos en que los receptores beta están presentes en cantidades relevantes, tales como el hueso, el sistema nervioso central y el endotelio vascular. Que la apigenina incremente los procesos de proliferación y diferenciación osteoblástica puede explicarse por el efecto que posee sobre los receptores beta presentes en los osteoblastos.

La apigenina, de modo análogo al β -estradiol, aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina, un marcador temprano de la diferenciación osteoblástica, y aumenta la expresión génica de la osteocalcina en estas células, un marcador más tardío de diferenciación osteoblástica (**Mak, 2006; Siddiqui, 2010**).

En un estudio realizado en calota de ratones y tibias de conejos se demostró que apigenina inhibe el TNF α , el IFN γ y la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos, y atenúa la formación y función de los osteoclastos. Esto podría ser debido a la inducción de la osteogénesis por los elevados niveles de proteína B morfogenética BMP-6. Además, apigenina indujo apoptosis de los osteoclastos maduros obtenidos de tibias de conejos e inhibió la reabsorción ósea (**Bandyopadhyay, 2006**).

La actividad osteogénica de la apigenina es provocada por la estimulación de la producción de células osteoprogenitoras en la médula ósea mediante la expresión génica de proteínas morfogenéticas del hueso 2 y 6 (BMP-2 y BMP-6) y mediante la expresión del polipéptido α 1 del colágeno tipo I

(COL1A1) necesario para la diferenciación de estas células (**Bandyopadhyay, 2006; Siddiqui, 2010**).

A nivel de los osteoclastos, la apigenina inhibe el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que induce la secreción de varias citoquinas osteoclastogénicas por parte de la línea celular osteoblástica. El TNF- α induce la producción de interleucina-6 (IL-6), RANTES (regulador de la expresión, secreción y activación de células T) y proteína quimiotáctica monocítica 1 y 3 (MCP-1 y MCP-3). Por otra parte, incrementa la producción de IFN-gamma, que estimula la secreción de monoquinas CXCL-9 y CXCL-10 en los osteoblastos. Estas citoquinas inflamatorias estimulan a los osteoblastos, a los fibroblastos y a las células T activadas para producir RANKL, que a su vez induce la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea (**Shigeyama, 2000; Bandyopadhyay, 2006; Choi, 2007**).

De forma similar, la apigenina inhibe la expresión de marcadores de la diferenciación osteoclástica como la fosfatasa ácida tártrato-resistente (TRAP), el receptor activador del factor nuclear kappa (RANK) y el receptor de calcitonina, lo que provoca la inhibición de la formación de osteoclastos multinucleados (**Siddiqui, 2010**). Esta inhibición tiene lugar incluso en células precursoras osteoclásticas obtenidas de la médula ósea de ratones, después del tratamiento con RANKL y con el factor estimulante de la colonia de macrófagos (MCSF) (**Park, 2008; Choi, 2009**).

1.12.5.1.3. Osteoporosis

Muchas sustancias de origen vegetal tienen actividades estrogénicas. Debido a la capacidad de apigenina para unirse al receptor de estrógenos, tiene el potencial de contrarrestar los efectos nocivos causados sobre el hueso por el déficit de estrógenos.

Apigenina aumenta la diferenciación osteoblástica e inhibe la producción de factor de necrosis tumoral inducido por la producción de interleucina-6 y óxido nítrico en las células osteoblásticas MC3T3-E1 (**Choi, 2007**). En este estudio se investigaron los efectos de la apigenina sobre la función de las células MC3T3-E1 osteoblásticas y la producción de factores locales en los osteoblastos. La apigenina (0:01 μ M) aumentó significativamente el crecimiento de las células MC3T3-E1 y la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) y del contenido de colágeno en las células ($P < 0,05$). El efecto de la apigenina en el aumento de la actividad de ALP y el contenido de colágeno fue completamente impedido por la presencia de 10 (-6) cicloheximida M y 10-6 M tamoxifeno, lo que sugiere el efecto de apigenina desempeña un papel crucial en la formación y reabsorción ósea.

También se comprobó que el tratamiento con 10 μ M de apigenina descendió la producción de IL-6 y óxido nítrico (NO) en los osteoblastos por parte del TNF α , lo que postula a este flavonoide como una nueva herramienta en el tratamiento farmacológico de la osteoporosis (**Choi, 2007**).

1.12.5.1.4. Artritis reumatoide

El incremento espontáneo de citoquinas osteoclastogénicas como la interleuquina-1 (IL-1), IL-6 y TNF α está asociado con un déficit de estrógenos debido a la menopausia (**Pfeilschifter, 2002**). Los datos disponibles sugieren que en la artritis reumatoide (RA), que es una enfermedad inflamatoria responsable de la pérdida local y sistémica de hueso parecida a los síntomas de la osteoporosis postmenopáusica, intervienen las mismas citoquinas osteoclastogénicas (**Weitzmann, 2005**).

En la médula ósea, los osteoblastos y adipocitos derivan de células madre mesenquimales (**Aubin, 2002**). Los adipocitos pueden proporcionar los factores de la superficie celular necesarios para la diferenciación osteoclástica *in vitro* (**Kelly, 1998**). Recientes hallazgos muestran que el elevado número de adipocitos en la médula ósea está directamente relacionado con la pérdida de hueso, ya que las células grasas reemplazan a los osteoblastos (**Botolin, 2005**). De igual modo, las adipoquinas o citoquinas inflamatorias productoras de adipocitos como la IL-6, MCP-1 y leptina, pueden contribuir significativamente a la pérdida ósea (**Wang, 2005**).

El TNF α que es producido principalmente por macrófagos, células mesenquimales de médula ósea y monocitos, actúa directamente sobre los osteoclastos así como en varios procesos de osteoclastogénesis (**Thomson, 1987**). Como el déficit de estrógenos es el resultado de la expansión del TNF α secretado por linfocitos T (**Roggia, 2001**), anular su efecto es el objetivo en la terapéutica de la RA. Sin embargo, la terapia anti-TNF α en pacientes con RA puede aumentar el riesgo de infecciones por *Mycobacterium*, especialmente la tuberculosis (**Ehlers, 2005**), infarto y lupus (**Cush, 2004**).

Otro mecanismo por el que el TNF α promueve la osteoclastogénesis es con la activación de los osteoblastos para secretar elevados niveles de varias citoquinas osteoclásticas como IL-6 y MCP-1 (**Zhu, 1994**).

1.12.5.2. Otras aplicaciones médicas de la apigenina

1.12.5.2.1. Quimioterapia

La manzanilla es una de las fuentes naturales más ricas en apigenina (840 mg/100 g frente a sólo 9 mg/100 g con respecto a la menta) **(McKay y Blumberg, 2006)**. Apigenina influye en multitud de procesos como la progresión del ciclo celular, expresión de los genes, regulación del transporte a través de la membrana celular, producción de citoquinas y respuesta inflamatoria. Por todo ello es considerado un quimioterápico natural ya que, además de su efecto antiinflamatorio, inhibe la proliferación celular y la expresión de los oncogenes. Es más, puede inhibir determinadas enzimas que participan en los procesos de señalización intracelular, suprimiendo la acción de los oncogenes **(Kuo y Yang, 1995)**.

Respecto a la propiedad anticáncer de la apigenina está comprobado que disminuye el riesgo de padecer cáncer de mama, útero, colon, pulmón, tracto digestivo, piel, endometrio, ovarios, próstata, tiroides, hígado y ciertas neoplasias hematológicas. De igual modo puede proteger respecto a otras enfermedades afectadas por el proceso oxidativo como trastornos neurológicos y cardiovasculares **(Shukla y Gupta 2010)**.

En este estudio **(Choi, 2008)**, se determinó la función mecánica de la cascada de caspasas en la apoptosis extrínseca e intrínseca inducida por la apigenina, que ha sido marcada como candidata en el desarrollo de medicamentos no citotóxicos contra el cáncer. El tratamiento con apigenina (1-100 μ M) inhibió significativamente la proliferación de células MDA-MB-453 presentes en el cáncer de mama humano de manera dosis y tiempo dependiente. El presente trabajo apoya la hipótesis de que la apigenina activa la apoptosis por vía intrínseca y extrínseca.

Otro trabajo al respecto **(Lin, 2012)**, fue realizado *in vivo* en ratones mediante citometría de flujo y demostraron cómo la apigenina induce la apoptosis a través de la disfunción mitocondrial en las células U-2 OS presentes en el osteosarcoma humano, inhibiendo el crecimiento de este tipo de tumores. Los niveles de proteínas relacionadas con la apoptosis se midieron por inmunotransferencia y los resultados fueron que la apigenina disminuyó significativamente la viabilidad celular e indujo la apoptosis eficazmente a través de las activaciones de la caspasa-3, -8, -9, y BAX. En conclusión, apigenina ofrece resultados esperanzadores para el tratamiento del osteosarcoma humano.

Según Mak y cols., la apigenina suprime el crecimiento de células cancerosas a través de ER β . Dos flavonoides, la genisteína y la apigenina, han sido implicados como agentes quimiopreventivos contra los cánceres de próstata y de mama. Sin embargo, sus efectos protectores contra el cáncer pueden variar respectivamente. El objetivo de este estudio fue determinar si la acción de estos flavonoides en células cancerígenas, (DU-145) en la próstata, y (MDA-MB-231) en mama, demostraban efectos antiproliferativos e inducían la

apoptosis a través de la activación de la caspasa-3 en estas dos líneas celulares. En los ensayos, ambos flavonoides mostraron una alta especificidad hacia la transactivación de ER β , particularmente a concentraciones más bajas, aunque en el estudio en mamíferos, apigenina se encontró que era más selectiva que la genisteína hacia ER β .

Los datos revelan por primera vez que la acción anticancerígena de apigenina está mediada, en parte, por ER β y que tanto apigenina como genisteína suprimen el crecimiento celular mediante la inducción a la apoptosis en las células DU-145 y MDA-MB-231 (**Mak, 2006**).

1.12.5.2.2. Diabetes

Se ha comprobado que apigenina atenúa el daño celular por oxidación en las células β pancreáticas de importancia en la diabetes. Es un hecho que la toxicidad de la glucosa contribuye a la insuficiencia progresiva de las células β y al desarrollo de la diabetes (**Tiedge, 1997**).

Por su parte, el estrés oxidativo es un aspecto importante en la toxicidad de la glucosa de las células β pancreáticas. A colación de este dato cabe destacar que ya ha sido investigado si la apigenina protege las células β pancreáticas de la 2-desoxi-D-ribosa (drib) que es la causante de la oxidación que origina el daño celular (**Suh, 2011**).

1.12.5.2.3. Terapia inmunológica

Aunque se ha demostrado que la apigenina posee funciones antiinflamatorias, anticancerígenas, y depuradora de radicales libres, su influencia sobre los efectos inmunoestimuladores y la maduración de las células dendríticas permanece, en su mayor parte, desconocida (**Yoon, 2006**). Este estudio trata de determinar si la apigenina influye en la expresión de moléculas de superficie, la absorción de dextrano, la producción de citoquinas, y la diferenciación de células T, así como las vías de señalización que subyacen a estos fenómenos en médula ósea derivada de células dendríticas (DC) en roedores. Se considera que las DC juegan un papel importante en la hipersensibilidad y tolerancia de los trasplantes (**Thomson, 1995; Starzl and Zinkernagel, 1998**)

En presencia de la apigenina la expresión de CD80, CD86, y en especial las moléculas de clase I y clase II del complejo de histocompatibilidad, en DC fue significativamente suprimida, y afectó a la expresión de la IL-12 inducida por lipopolisacáridos. Las DC resultaron altamente eficientes en la captura de

antígenos, como se evidencia por la observación de la endocitosis mediada por el receptor de manosa en la presencia de apigenina (**Yoon, 2006**).

Estos hallazgos proporcionan nuevos conocimientos sobre las funciones inmunofarmacológicas de la apigenina y sus efectos sobre las DC, y pueden ser útiles en el desarrollo de terapias coadyuvantes para las personas que sufren de enfermedades agudas o crónicas asociadas a las DC.

No sólo apigenina inhibe la maduración fenotípica de DC en roedores, sino que también deteriora la secreción de IL-12, no influye en la producción de IL-10 durante la maduración de las DC inducidas por LPS (**An, 2002**), deteriora la capacidad aloestimuladora de las DC (**Lyons, 2000**) y suprime la fosforilación inducida por LPS de MAPK y la translocación nuclear de la subunidad del NF-B p65 en DC (**Rescigno, 1998**).

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existen numerosas patologías bucales congénitas o asociadas a traumatismos, infecciones y cáncer, que provocan defectos óseos y, cada vez más, los pacientes demandan restablecer su anatomía y funcionalidad, así como recuperar la estética, pero en un corto período de tiempo.

En la odontología actual el defecto óseo más frecuente es el provocado por la extracción de piezas dentales. Sin embargo, a pesar de los avances tecnológicos, principalmente en el campo de la endodoncia y la odontología restauradora, la exodoncia sigue siendo uno de los procedimientos quirúrgicos más realizados diariamente en las clínicas dentales, generalmente por problemas de caries, traumatismos y enfermedad periodontal.

Cuando se realiza una extracción dental, sin la inmediata colocación de un implante, comienza inevitablemente un proceso de reabsorción del hueso alveolar que afecta tanto en sentido vertical como horizontal, siendo este el principal inconveniente para la rehabilitación mediante la colocación de implantes dentales, ya que el éxito de estos implantes depende de la existencia de un suficiente soporte óseo. Por lo tanto, se hace imprescindible una fase de regeneración del volumen de hueso perdido previa a la colocación de los implantes. De hecho se vienen realizando desde hace años varias técnicas para la regeneración ósea como la condensación local de hueso, la distracción ósea, la colocación de injertos óseos y el uso de biomateriales en el lecho alveolar post exodoncia.

Esto no es un problema actual ya que durante varias décadas se ha investigado el funcionamiento de diversos sustitutos óseos que respondan a cada una de las necesidades de reconstrucción. Así se ha permitido determinar qué estructuras donantes son especialmente beneficiosas, no sólo a nivel intraoral, con el fin de aumentar las probabilidades de éxito del tratamiento y disminuir la utilización de hueso autógeno considerado hoy en día como el sustituto óseo de mejores propiedades.

El éxito clínico de un sustituto óseo depende de la zona donante, del lecho receptor y de otros factores como la contaminación bacteriana, el estímulo mecánico y los factores de crecimiento incorporados con el procedimiento.

El estudio de los injertos representa una técnica fundamental en la reconstrucción ósea gracias a sus propiedades de osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis. Estos, según su origen, pueden ser autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos. El autoinjerto es el ideal, pero no siempre se encuentra disponible o en cantidad suficiente para regenerar un defecto demasiado grande. Además necesita un prolongado tiempo de

intervención y conlleva mayores complicaciones post quirúrgicas. Todo esto sin estar exento de sufrir infecciones, sangrado, dolor, hinchazón, daños a las raíces dentales adyacentes, a la zona donante o alteraciones visibles de la región mandibular después de la extracción de hueso autógeno.

De igual manera, se han estudiado diversos biomateriales, sin embargo, estos no poseen la capacidad natural de inducir el proceso de regeneración ósea, haciendo de ellos unos meros materiales de relleno, que no sustituyen las características de los injertos, aunque utilizados conjuntamente, pueden mejorar los resultados.

Por lo tanto, son necesarios mayores estudios que prueben la eficacia de nuevos materiales, en este caso un flavonoide de origen natural, con el fin de valorar si con su aplicación en los alveolos post extracción somos capaces de reducir el tiempo de regeneración ósea, acelerando la recuperación del paciente, minimizando los inconvenientes de los efectos secundarios derivados de los tratamientos anteriormente descritos y, por qué no decirlo, reduciendo los costes de materiales y el tiempo del paciente en clínica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Evaluar desde el punto de vista histológico la osteogénesis inducida por el flavonoide (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*) en estadios tempranos de alveolos post-extracción de perros American Fox Hound.

3.2. Objetivos específicos

Determinar histológicamente a los 30, 45 y 60 días la neoformación ósea de alveolos post extracción tratados con el flavonoide (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*).

Determinar histológicamente a los 30, 45 y 60 días la neoformación ósea natural de alveolos post extracción sin aplicar en ellos ningún biomaterial.

Determinar histológicamente a los 30, 45 y 60 días la neoformación ósea de alveolos post extracción tratados con otro osteoinductor (N-Acetyl-5-methoxytryptamine, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*).

Comparar los resultados obtenidos entre la cicatrización con el flavonoide (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*), los alveolos sin biomaterial y los tratados con el osteoinductor (N-Acetyl-5-methoxytryptamine, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Animales de experimentación

Este estudio fue realizado sobre nueve perros macho de raza American Fox Hound (**Cutando, 2007; Park, 2007; Fickl, 2008; Guardia, 2011**) de edad comprendida entre 14-16 meses y con un peso aproximado de entre 16-18 kg procedentes del animalario de la Universidad de Murcia. Los animales, una vez recibidos, fueron correctamente identificados y se alimentaron *ad-libitum* con dieta sólida a base de pienso y agua.

El estudio siguió en todo momento los principios éticos en investigación definidos por el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, así como la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

El centro donde realizó la intervención fue el quirófano del animalario de la Universidad de Murcia, con sede en Espinardo, eligiendo la misma localización para las condiciones de alojamiento y cuidados postquirúrgicos.

	Sep	Oct	Nov	Dic
Tartrectomía				
Radiografías periapicales				
Exodoncia con odontosección				
Colocación de biomateriales post extracción				
Toma de biopsias				
Fijación de las muestras				
Descalcificación de las muestras				
Deshidratación, corte y tinción				
Estudio histológico				
Valoración de los resultados				

Tabla 4. Cronograma del estudio experimental.

4.2. Listado de materiales

- Cámara fotográfica Nikon D60.
- Aparato de rayos X.
- Ultrasonidos Satelec.
- Punta de ultrasonidos Scaling GD1.
- Lápiz Staedler Noris® 120 HB 2.
- Bisturíes desechables con hojas del número 15.

- Separadores Minnesota.
- Periostotomo Molt.
- Periostotomo Williger.
- Espejos intraorales.
- Sonda periodontal.
- Jeringas de anestesia con autoaspiración.
- Agujas de anestesia Normon Jet Plus 30 G 0,3 x 25 mm.
- Carpules de anestesia articaína Ultracain[®] con Epinefrina 40/0,005 mg/ml.
- Turbina.
- Fresas de odontosección.
- Aspirador quirúrgico.
- Pinzas mosquito.
- Bateas.
- Flavonoide (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone, Sigma-Aldrich Química, S.L.)
- Osteoinductor (N-Acetyl-5-methoxytryptamine, Sigma-Aldrich Química, S.L.)
- Membranas de colágeno.
- Porta agujas Castroviejo 18 cm 1152TC/18.
- Tijeras de Mayo.
- Sutura 3/0 TB-15. Lorca Marín[®] Ref. 55346.
- Fresa de Trefina Ø 3mm.
- Gasas.
- Digluconato de clorhexidina 2%.
- Suero glucosalino.

4.3. Procedimiento quirúrgico

Todas las intervenciones se realizaron bajo la supervisión del veterinario adscrito al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia. La inducción anestésica se llevó a cabo con:

- Calmo Neosan[®] Inyectable (Maleato de Azepromacina). Por vía intramuscular 0.5-1mg/kg de peso (1-2ml/10kg de peso), como tranquilizante antes de la anestesia general.
- Imalgene[®] (clorhidrato de ketamina, clorobutanol y excipientes). Por vía intravenosa 5-8 mg de ketamina/kg de peso, equivalente a 0.1-0.16 de Imalgene 500/kg de peso.
- Atropina. Por vía subcutánea 0.05 mg/kg de peso, para disminuir las secreciones.

Bajo anestesia general, se inició el procedimiento realizando una tartrectomía con ultrasonidos para eliminar el sarro y contar con un campo quirúrgico limpio.



Figura 1. Tartrectomía con ultrasonidos.

Se tomaron unas radiografías intraorales para conocer el punto de bifurcación de las piezas a extraer con el fin de realizar la exodoncia por odontosección y que, de esta manera, el alveolo conservase la máxima integridad posible. Con un lápiz, y siguiendo la guía radiográfica, se trazó una línea en la superficie vestibular de los dientes a extraer, perpendicular al margen gingival, para realizar la odontosección sin modificar la anatomía del alveolo.

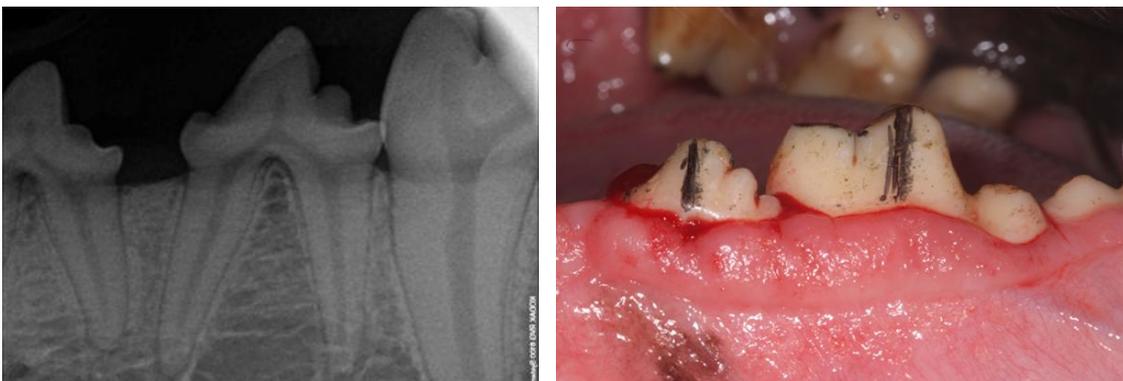
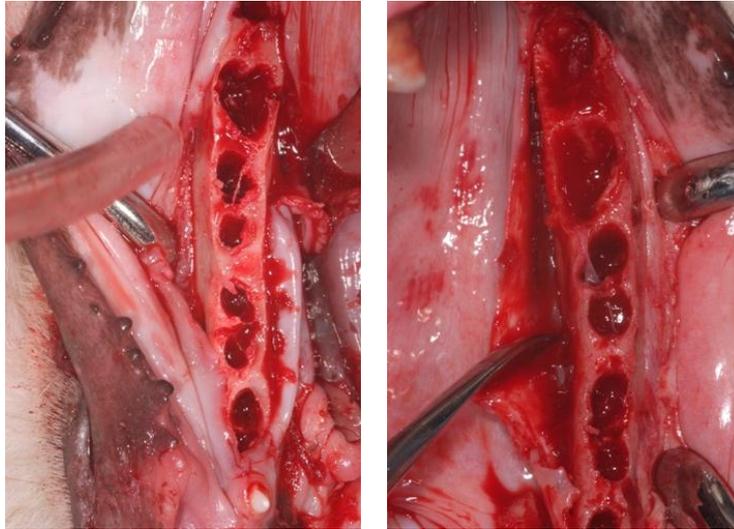


Figura 2 (izquierda). Radiografía intraoral preoperatoria.

Figura 3 (derecha). Planificación de la odontosección para no modificar la anatomía alveolar.

Con una jeringa de autoaspiración, aguja y carpules de articaína con epinefrina, se comenzó a infiltrar el anestésico en la mucosa vestibular y lingual. Acto seguido, con una turbina y fresas de odontosección se comenzó a dividir las piezas para proceder con las exodoncias. Se realizaron un total de 10

exodoncias en cada perro, extrayendo bilateralmente los premolares P2, P3, P4 y los molares M1 y M2 mandibulares, conservando el sector anterior de canino a canino, el premolar P1 y el molar M3 para mantener una mínima función masticatoria. En el maxilar superior no se realizó ninguna intervención.



Figuras 4 y 5. Exodoncia bilateral de premolares P2, P3 y P4 y molares M1 y M2 inferiores.

La distribución de los biomateriales en los alveolos fue la siguiente:

- Se colocó una esponja de colágeno impregnada con el flavonoide (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*) en los alvéolos P2, M1 y M2 del lado izquierdo.
- Se colocó una esponja de colágeno impregnada en otro osteoinductor (N-Acetyl-5-methoxytryptamine, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*) en los alveolos P2, M1 y M2 del lado derecho.
- Los alvéolos P3 y P4 de ambos lados se dejaron cicatrizar sin biomaterial.

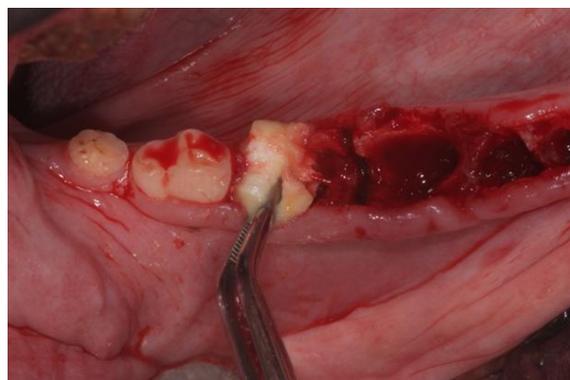


Figura 6. Colocación de las esponjas con flavonoides.

Durante todo el procedimiento quirúrgico, la vía intravenosa de cada perro se mantuvo con suero glucosalino (250 cm³), que fue transfundido en su totalidad para facilitar la hidratación y recuperación post quirúrgica del animal.

Una vez colocados los biomateriales se suturó con puntos simples (3/0 TB-15. Lorca Marín Ref. 55346), para conseguir que la encía cubriese completamente las membranas. Al terminar la intervención quirúrgica, se trasladó a los perros a su estabulario para que pudieran recuperarse progresivamente de la operación bajo supervisión veterinaria y, posteriormente cada 2 días hasta un total de 4 días, se les administraron por vía intramuscular antibióticos, 2 ml de Bivamox[®] suspensión inyectable (Amoxicilina trihidrato), y antiinflamatorios, 1-2 ml de Voren[®] suspensión inyectable (Dexametasona 21-isonicotinato 1 mg), para prevenir la infección e inflamación post-operatorias, como establecen los comités de ética de experimentación animal.

Los días posteriores tuvieron lugar los cuidados de las heridas post extracción, controlando el estado general de los animales, siendo alimentados *ad-libitum* con dieta blanda a base de pienso y agua.

4.4. Toma de biopsias

Para la toma de biopsias, los nueve perros se dividieron en tres grupos. El primer grupo se intervino a los 30 días, el segundo grupo a los 45 días y el tercer grupo a los 60 días.

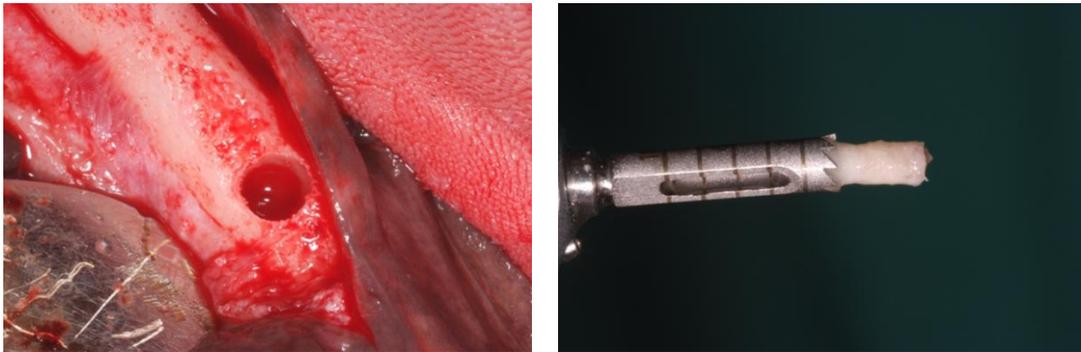
Bajo el mismo procedimiento de anestesia general que hemos descrito anteriormente para la primera fase del estudio, se comenzó limpiando la mucosa mediante gasas impregnadas en digluconato de clorhexidina al 2%. Posteriormente se infiltró el anestésico local en la encía vestibular y lingual con el fin de realizar una incisión supracrestal con bisturí del número 15 que permitiese despegar un colgajo de espesor total, usando periostotomos de Molt y Williger, desde el canino hasta el segundo molar.



Figuras 7 y 8. Despegamiento del colgajo para proceder a la toma de biopsias.

En cada perro se realizaron un total de 10 biopsias mediante una trefina de Ø 3mm:

- Tres correspondientes a alveolos P2, M1 y M2 del lado izquierdo, donde se introdujo el flavonoide (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*).
- Tres correspondientes a alveolos P2, M1 y M2 del lado derecho, donde se introdujo otro osteoinductor (N-Acetyl-5-methoxytryptamine, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*).
- Cuatro correspondientes a alveolos control, cicatrizados sin biomaterial.



Figuras 9 y 10. Extracción del cilindro de hueso con trefina de Ø 3mm.

4.5. Preparación de las muestras y análisis histológico

Los cilindros de hueso obtenido se depositaron individualizadamente en frascos de 10cc con formaldehído al 4% durante 15 días. Las muestras se descalcificaron con TBD-2 (Anatomical Pathology International, Runcon, Cheshire, UK) durante 30 días y, tras la deshidratación e inclusión en parafina, se realizaron cortes de 8 micras para su tinción con azul de toluidina y hematoxilina-eosina.



Figura 11. Conservación individual en formaldehído al 4%.

Todos los análisis fueron realizados por el mismo investigador que no conocía previamente a qué grupo pertenecía cada muestra. Para el estudio histológico se utilizó un microscopio óptico (Olympus CH30, Nagano, Japón), al que se le acopló una cámara digital (Olympus DP12, Nagano, Japón). Las imágenes capturadas se magnificaron a 20x para valorarlas digitalmente analizando 10 campos por cada muestra

Para el análisis de imagen se utilizó el software Microimage 4.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). En cada una de las muestras se valoró únicamente el área de hueso neoformado, sin tener en cuenta el tejido conjuntivo. De la totalidad del área ósea se determinará el porcentaje de hueso inmaduro.

El hueso inmaduro se caracteriza por presentar una mineralización totalmente desorganizada, con elevados índices de celularidad y grandes cavidades medulares, a diferencia del hueso maduro donde predominan osteonas formadas por láminas de hueso que se organizan de forma concéntrica alrededor de los conductos de Havers.

4.6. Análisis estadístico

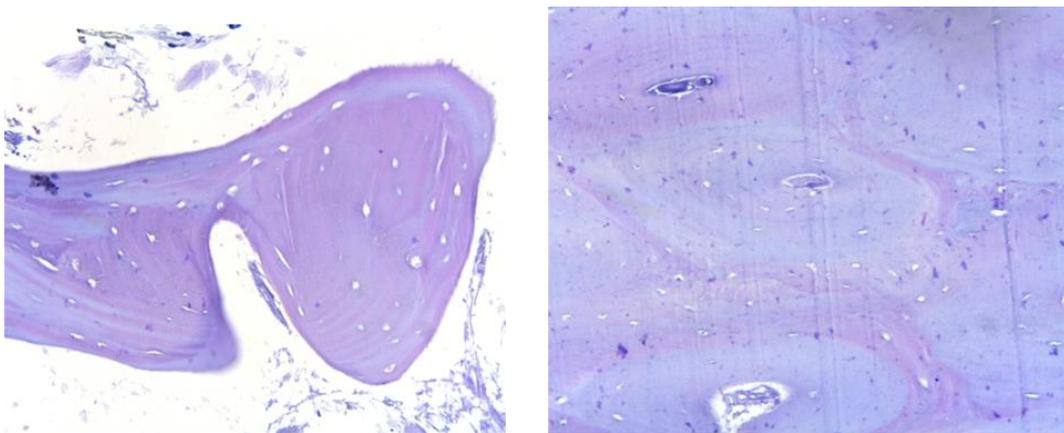
El análisis estadístico fue llevado a cabo usando el software SPSS 19.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0,05$. Todos los datos se expresaron como la significación \pm la desviación estándar. El test *t-Student* fue utilizado para analizar diferencias entre las variables.

5. RESULTADOS

Con el análisis de imagen de las muestras y valorando 10 campos por muestra, se determinó la cantidad de hueso maduro e inmaduro en cada una de ellas.

La distinción entre la maduración ósea se puede constatar por su morfología. El hueso maduro se caracteriza por presentar imágenes en las que predomina la presencia de osteonas formadas por láminas de hueso que se organizan de forma concéntrica alrededor de los conductos de Havers, en cuyo interior se encuentran vasos sanguíneos encargados del intercambio de nutrientes en el seno de la masa ósea. Por su parte, el hueso inmaduro ofrece imágenes caracterizadas por hueso mineralizado totalmente desorganizado, con elevados índices de celularidad y grandes cavidades medulares.

FLAVONOIDES 30 DÍAS



Figuras 12 y 13. Flavonoides 30 días (izquierda) y 60 días (derecha). Tinción azul de toluidina.

7755

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
202019,59	53594,59	26,53	73,47059758
184739,28	61169,06	33,11	66,88897997
214133,95	71566,92	33,42	66,57843373
180413,66	66695,6	36,97	63,03184581
168876,02	92337,62	54,68	45,32224291
171766,86	56010,07	32,61	67,39180655
181013,53	69681,48	38,50	61,50482232
195840,91	86532,26	44,18	55,81502353
201966,13	85141,26	42,16	57,84379292
210391,17	84861,59	40,34	59,6648519
(μm)	(μm)		
		promedio: 38,25	61,7512397
		mediana: 37,73	62,2683341

7728

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
181510	49024,9	27,00947606	72,99052394
173201,97	63859,77	36,87011759	63,12988241
183284,58	80531,38	43,93789156	56,06210844
167080,84	61136,53	36,59098793	63,40901207
164803,48	56342,36	34,18760332	65,81239668
136851,59	36919,58	26,9778232	73,0221768
171193,89	63167,93	36,89847225	63,10152775
190635,41	65742,32	34,48589116	65,51410884
158064,61	48355,38	30,59216102	69,40783898
172113,97	67806,26	39,39613966	60,60386034
(μm)	(μm)	Promedio: 34,69	65,30
		mediana: 35,53	64,46

7731F

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
114547,17	33594,77	29,32832823	70,67167177
135640,28	53823,84	39,68131001	60,31868999
124226,12	52573,69	42,32096277	57,67903723
130814,27	46508,6	35,55315487	64,44684513
155070,55	47776,63	30,80960892	69,19039108
138774,17	30275,57	21,81643025	78,18356975
117989,68	33724,04	28,58219465	71,41780535
145265,75	32930,69	22,66927338	77,33072662
119352,75	43234,02	36,22373175	63,77626825
112858,79	40126,54	35,55464311	64,44535689
(μm)	(μm)	promedio: 32,25	67,74
		mediana: 33,18	66,81

7730F

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
154667,58	51614,79	33,3714344	66,6285656
165917,05	46899,48	28,26682369	71,73317631
160903,33	41683,09	25,90567268	74,09432732
163277,59	50294,81	30,80325353	69,19674647
127134,84	46178,69	36,32260834	63,67739166
130753,8	56895,22	43,51324397	56,48675603
158556,83	39694,78	25,03504895	74,96495105
175097,3	56274,06	32,13873658	67,86126342
171049,97	46266,91	27,04876826	72,95123174
137247,59	30758,94	22,41127877	77,58872123
(μm)	(μm)	promedio: 30,48	69,51
		mediana: 29,53	70,46

7760

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
97908,45	30176,96	30,82160937	69,17839063
133821,94	23098,29	17,26046566	82,73953434
142456,83	51825,64	36,37989137	63,62010863
99353,44	39156,91	39,41173048	60,58826952
135642,5	21122,74	15,57236117	84,42763883
148155,22	62873,11	42,4373235	57,5626765
106633,42	30869,3	28,94899179	71,05100821
89843,96	30315,77	33,74269122	66,25730878
146528,33	41998,18	28,662157	71,337843
67688,05	19851,13	29,32737758	70,67262242
(μm)	(μm)		
		promedio: 30,25	69,74
		mediana: 30,07	69,92

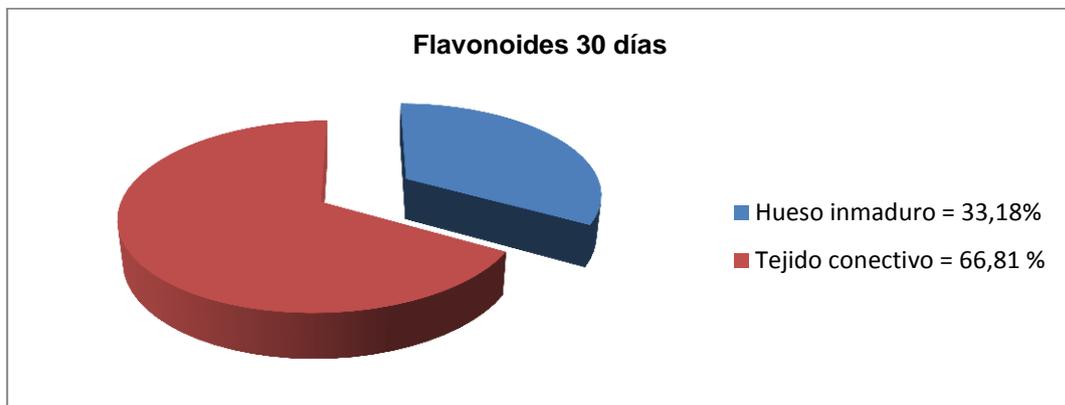
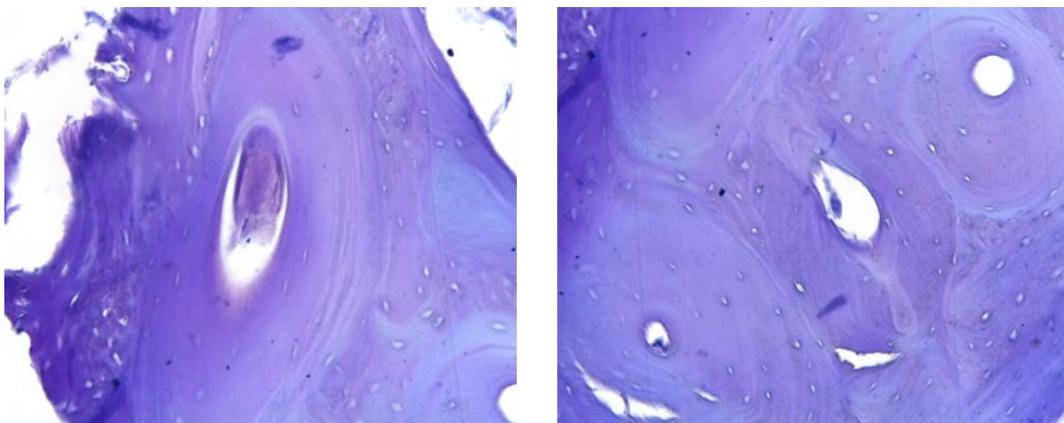


Gráfico 4. Flavonoides. Porcentaje de hueso inmaduro y tejido conectivo a los 30 días.

OTRO OSTEOINDUCTOR 30 DÍAS



Figuras 14 y 15. Otro osteoinductor 30 días (izquierda) y 60 días (derecha). Tinción azul de toluidina.

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

7727

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
112638,23	36314,61	32,24	67,76
141472,55	35103,8	24,81	75,19
170331,91	59343,23	34,83	65,17
140438,88	50033,71	35,62	64,38
137935,52	26302,52	19,06	80,94
180057,34	51932,1	28,84	71,16
125855,4	39170,36	31,12	68,88
152768,69	45455	29,75	70,25
170917,3	57201,96	33,46	66,54
137341,09	60019,23	43,7	56,3
(μm)	(μm)		
		promedio: 31,34	68,65
		Mediana: 31,68	68,32

7744

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
156474,67	62509,14	39,9	60,05159174
151942,97	52917,23	34,8	65,17296588
148946,02	46869,84	31,5	68,53233138
198074,14	59371,16	30,0	70,02578933
145224,7	42147,55	29,0	70,9776987
172337,08	45103,12	26,2	73,82854578
170909,8	35903,28	21,0	78,99284886
142810,58	22381,24	15,7	84,32802388
167501,02	29930,5	17,9	82,13115359
147337,86	15868,54	10,8	89,22982864
(μm)	(μm)		
		Promedio: 25,7	74,32
		Mediana: 27,6	72,40

7757

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
188103,61	34408,21	18,29215824	81,70784176
182741,25	36366,38	19,90047677	80,09952323
180141,83	39481,54	21,91691957	78,08308043
170068,25	44261,91	26,02596899	73,97403101
174436,78	51630,97	29,59867179	70,40132821
147762,64	32979,57	22,31928856	77,68071144
169619,45	38586,33	22,74876496	77,25123504
163084,63	47577,7	29,17362599	70,82637401
130665,41	28390,3	21,72747937	78,27252063
127227,16	25206,68	19,81234196	80,18765804
(μm)	(μm)		
		promedio: 23,15	76,84
		mediana: 22,11	77,88

7735

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
142222,98	11819,53	8,310562752	91,68943725
165890,98	0	0	100
187638,97	0	0	100
142003,61	29980,4	21,11242102	78,88757898
149024,88	19141,58	12,8445532	87,1554468
159435,17	25073,14	15,72622904	84,27377096
166280,17	47013,25	28,27351572	71,72648428
130500,7	26237,45	20,10521783	79,89478217
124609,84	27453,2	22,03132594	77,96867406
129193,33	23776,67	18,40394547	81,59605453
(μm)	(μm)		
		promedio: 14,68	85,31
		mediana: 17,06	82,93

7747

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
188371,69	15567,76	8,26	91,7356159
153438,03	49235,25	32,09	67,9119642
139672,61	52282,61	37,43	62,56774324
143701,53	47138,27	32,80	67,19709943
134477,33	24010,86	17,85	82,14505002
172628,33	9183,82	5,32	94,68000415
99758,63	18424,02	18,47	81,53140235
152994,86	43173,05	28,22	71,78137226
106457,14	16997,42	15,97	84,03355566
156382,19	0	0	100
(μm)	(μm)		
		promedio: 19,64	80,35
		mediana: 18,16	81,83

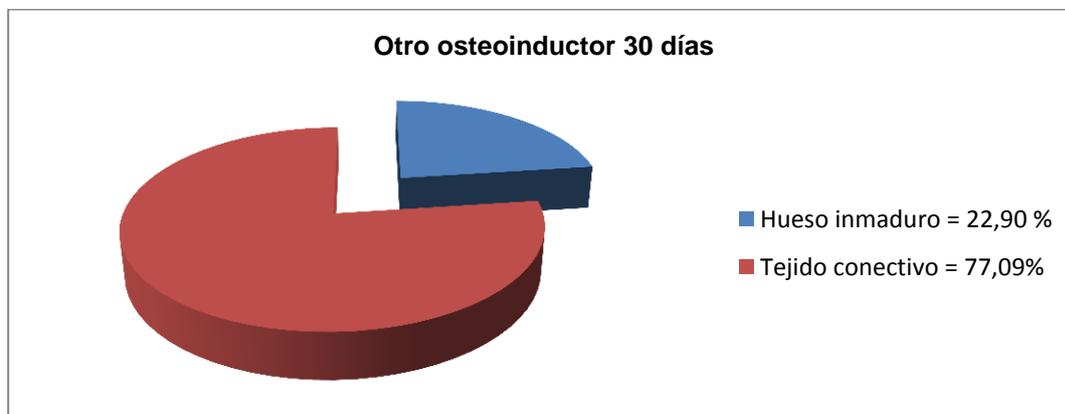


Gráfico 5. Otro osteoinductor. Porcentaje de hueso inmaduro y tejido conectivo a los 30 días.

FLAVONOIDES 45 DIAS

7729

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
204870,08	70589,8	34,45588541	65,54411459
208057,11	72415,97	34,80581365	65,19418635
177173,16	47216,28	26,64979278	73,35020722
135003,11	34763,33	25,75002161	74,24997839
154701,98	35585,3	23,00248517	76,99751483
162965,91	20261,61	12,43303584	87,56696416
168790,84	59873,44	35,47197229	64,52802771
142902,05	29169,85	20,41247834	79,58752166
135393,83	23901,69	17,65345585	82,34654415
151420,09	33961,29	22,42852319	77,57147681
(μm)	(μm)		
		promedio: 25,30	74,69
		mediana: 24,37	75,62

7742

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
164775,73	45452,79	27,58463883	72,41536117
200666,58	18826,15	9,381806378	90,61819362
207812,52	42506,42	20,45421517	79,54578483
152150,42	30850,06	20,27602684	79,72397316
160550,27	43350,01	27,00089511	72,99910489
145701,94	40914,61	28,0810331	71,9189669
130092,28	33468,05	25,72639207	74,27360793
190806,23	33880,56	17,75652713	82,24347287
180581,25	25012,68	13,85120548	86,14879452
165077,03	58684,6	35,54982786	64,45017214
(μm)	(μm)		
		promedio: 22,56	77,43
		mediana: 23,09	76,90

7748

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
196901,83	28009,97	14,2	85,77465227
136642,78	21083,74	15,4	84,57017634
150519,95	35283,15	23,4	76,55915379
145857,44	29818,6	20,4	79,5563394
185461,59	40155,15	21,7	78,34853567
170299,38	22287,56	13,1	86,91271806
204229,5	0	0	100
174133,95	41705,91	24,0	76,04952394
206699,31	44735,73	21,6	78,35709756
130312,16	27561,86	21,2	78,84935681
(μm)	(μm)		
		promedio: 17,5	82,49
		mediana: 20,8	79,02

7734

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
153605,63	7137,6	4,65	95,35329532
109657,63	0,34	0	99,99968994
176025,53	0,34	0	99,99980685
202599,38	7670,7	3,79	96,21385811
190273,14	31141,13	16,37	83,63345977
192224,84	50004,75	26,01	73,98632248
166997,05	30421,02	18,22	81,78349857
148747,94	46529,04	31,28	68,71953991
185517,98	44607,32	24,04	75,95525781
155528,72	32257,07	20,74	79,25973415
(μm)	(μm)		
		promedio: 14,51	85,49
		mediana: 17,29	82,70

7750F

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
159286,83	40560	25,46349877	74,53650123
130627,42	31159,7	23,85387387	76,14612613
134095,14	33940,86	25,31102917	74,68897083
159144,09	24541,58	15,42098107	84,57901893
174154,91	25740,8	14,78040441	85,21959559
191268,83	14538,68	7,60117579	92,39882421
140917,47	5987,43	4,248891213	95,75110879
184427,92	24530,68	13,3009579	86,6990421
186401,94	4373,14	2,346080733	97,65391927
163826,53	20396,67	12,45016299	87,54983701
(μm)	(μm)		
		promedio: 14,47	85,52
		mediana: 14,04	85,95

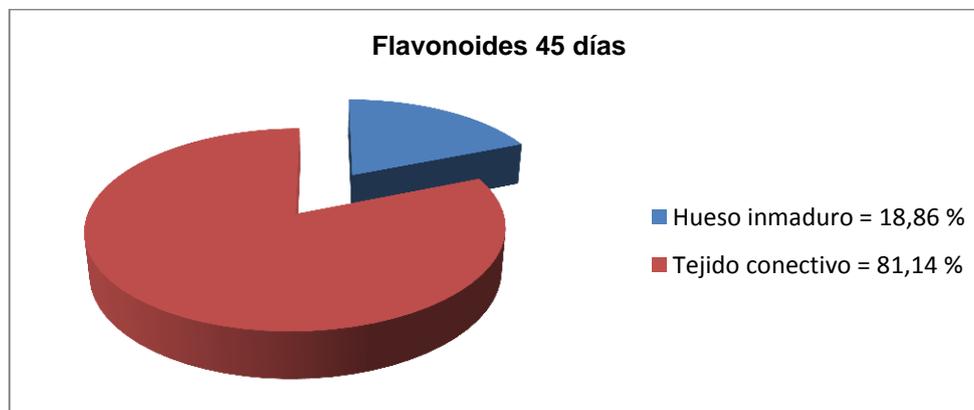


Gráfico 6. Flavonoides. Porcentaje de hueso inmaduro y tejido conectivo a los 45 días.

OTRO OSTEOINDUCTOR 45 DÍAS

7745

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
135988,75	25623,62	18,84245572	81,15754428
196718,56	13381,7	6,80245931	93,19754069
192792,34	12021,7	6,235569318	93,76443068
147806,41	21368,69	14,45721468	85,54278532
166957,88	17128,91	10,25941992	89,74058008
173738,81	33956,7	19,54468319	80,45531681
149276,44	4830,1	3,235674699	96,7643253
167015,95	18869,92	11,29827421	88,70172579
196656,91	29136,81	14,81606215	85,18393785
122593,09	12225,57	9,972478873	90,02752113
(μm)	(μm)		
		promedio: 11,54	88,45
		mediana: 10,77	89,22

7758

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
147775,06	8235,82	5,573213775	94,42678622
211381,58	0	0	100
218265,58	7488,29	3,430815798	96,5691842
186413,34	49963,71	26,80264728	73,19735272
171735,86	11559,11	6,730749187	93,26925081
174733,31	54019,37	30,91532462	69,08467538
202117,19	21021,23	10,40051566	89,59948434
204387,89	0	0	100
177114,22	10541,44	5,951775075	94,04822493
181479,52	44213,2	24,36263883	75,63736117
(μm)	(μm)		
		promedio: 11,41	88,58
		mediana: 6,34	93,65

7739

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
147266,66	17574,3	11,9	88,0663417
215474,03	0	0	100
152311,55	27902,16	18,3	81,68086399
213860,58	8793,96	4,1	95,88799394
210366,98	0	0	100
136927,91	50465,81	36,9	63,14424868
172124,86	0	0	100
184438,31	10408,42	5,6	94,35669303
181996,09	4393,74	2,4	97,58580528
108982,99	15693,28	14,4	85,60024826
(μm)	(μm)		
		promedio: 9,4	90,63
		mediana: 4,9	95,12

7752

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
167114,56	31346,71	18,75	81,25
164681,72	12105,15	7,35	92,65
178427,89	10136,42	5,68	94,32
164991,19	0	0	100
142946,84	10713,81	7,49	92,51
172703,44	22537,59	13,04	86,96
(μm)	(μm)		
		promedio: 8,71	91,28
		mediana: 7,42	92,58

7726

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
163114,09	34007,62	20,84897755	79,15102245
197384,34	3173,57	1,607812454	98,39218755
185814	17059,76	9,181095074	90,81890493
174935,66	11171,12	6,385844944	93,61415506
189869,14	0	0	100
214652,06	51771,31	24,118711	75,881289
202406,39	5245,86	2,591746239	97,40825376
206225,14	0	0	100
186586,39	34965,67	18,73966799	81,26033201
189139,48	0	0	100
(μm)	(μm)		
		promedio: 8,34	91,65
		mediana: 4,48	95,51



Gráfico 7. Otro osteoinductor. Porcentaje de hueso inmaduro y tejido conectivo a los 45 días.

FLAVONOIDES 60 DÍAS

7732

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
160289,67	33157,04	20,68569983	79,31430017
175920,61	16903,07	9,608351176	90,39164882
206947,3	14745,45	7,125219802	92,8747802
212659,83	18942,48	8,907408607	91,09259139
185881,61	23039,18	12,39454511	87,60545489
191440,69	5399,48	2,82044533	97,17955467
210713,23	51702,34	24,53682666	75,46317334
215691,19	5891,37	2,731391115	97,26860888
193632,88	24843,89	12,83040876	87,16959124
(μm)	(μm)		
		promedio: 11,29	88,70
		mediana: 9,60	90,39

7761

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
133558,3	22283,99	16,7	83,315159
157580,91	24936,72	15,8	84,17529128
177887,98	30984,44	17,4	82,58204967
196499,02	0	0	100
210951,69	19040,24	9,0	90,97412303
147941,81	20179	13,6	86,36017769
195984,66	25049,3	12,8	87,21874457
182216,16	14819,2	8,1	91,86724163
(μm)	(μm)		
		promedio: 11,7	88,31
		mediana: 13,2	86,78

7733

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
206655,2	6504,52	3,15	96,85247698
212357,52	22201,89	10,45	89,54504178
208449,52	23476,4	11,26	88,73760899
216093,66	22392,48	10,36	89,63760436
214921,34	18759,89	8,73	91,27127627
193679,38	9716,07	5,02	94,9834257
203960,73	4931,96	2,42	97,58190707
196447,92	31886,12	16,23	83,768665
203133,83	10772,74	5,30	94,69672777
158771,27	3575,36	2,25	97,74810644
(μm)	(μm)		
		promedio: 7,52	92,48
		mediana: 7,02	92,98

7756F

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
197829,89	1818,17	0,919057277	99,08094272
199337,23	0	0	100
156989,38	10127,06	6,450793041	93,54920696
162856,91	6470,29	3,972990768	96,02700923
193712,23	0	0	100
172892,84	7323,59	4,235912835	95,76408717
139448,81	7276,75	5,218223088	94,78177691
141057,98	5146,39	3,648421734	96,35157827
145533,14	19847,05	13,63747803	86,36252197
(μm)	(μm)		
		promedio: 4,23	95,76
		mediana: 3,97	96,02

7754F

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
188182,3	2872,45	1,526418797	98,4735812
207400,86	6651,85	3,20724321	96,79275679
205298,59	0	0	100
209456,63	12810,62	6,116120554	93,88387945
200731,64	6550,17	3,263147753	96,73685225
207572,72	14524,55	6,997330863	93,00266914
166953,27	3359,56	2,012275651	97,98772435
144071,63	9679,11	6,718262298	93,2817377
103743,61	0	0	100
(μm)	(μm)		
		promedio: 3,31	96,68
		mediana: 3,20	96,79

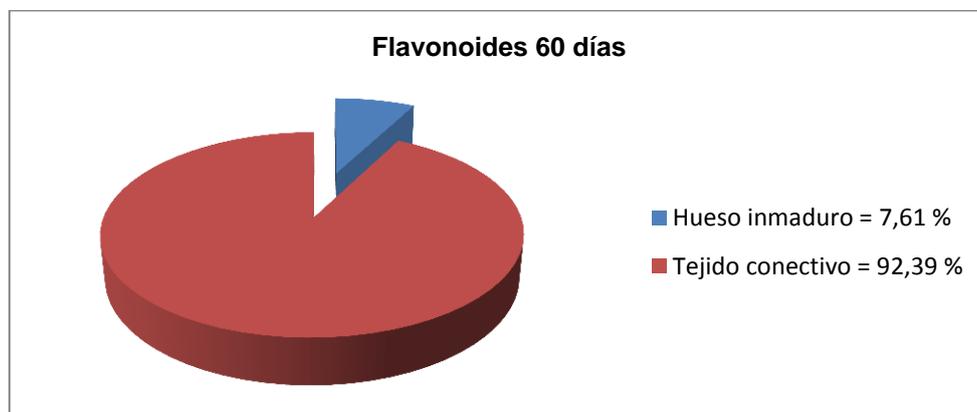


Gráfico 8. Flavonoides. Porcentaje de hueso inmaduro y tejido conectivo a los 60 días.

OTRO OSTEOINDUCTOR 60 DÍAS

7746M

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
144437,48	20314,75	14,06473583	85,93526417
167839,28	0	0	100
161302,56	19854,03	12,30856472	87,69143528
165462,63	29068,85	17,56822673	82,43177327
163346,75	24671,87	15,10398585	84,89601415
184584,11	13508,59	7,318392683	92,68160732
139182,77	2820,33	2,026349957	97,97365004
173355,25	0	0	100
146852,44	10222,26	6,960905791	93,03909421
141774,53	1419,11	1,000962585	98,99903742
(μm)	(μm)		
		promedio: 7,63	92,36
		mediana: 7,13	92,86

7738M

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
184777,08	4667,28	2,525897693	97,47410231
188923,86	11117,13	5,884449958	94,11555004
186268,41	22071,26	11,8491697	88,1508303
210781,88	10685,71	5,069558161	94,93044184
195361,8	40656,4	20,81082382	79,18917618
188175,48	23668,69	12,57798838	87,42201162
148637,56	5285,2	3,555763429	96,44423657
182185,33	0	0	100
187261,72	19908,36	10,63130254	89,36869746
186778,52	3683	1,971854151	98,02814585
(μm)	(μm)		
		promedio: 7,48	92,51
		mediana: 5,47	94,52

7736

Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
177651,06	24225,29	13,63	86,37
189246,45	27176,77	14,36	85,64
213600,67	11225,79	5,25	94,75
206670,88	14319,14	6,92	93,08
213924,97	0	0	100
205575,7	17515,54	8,52	91,48
169477,08	9762,4	5,76	94,24
202471,97	0	0	100
211497,05	19137,66	9,04	90,96
205900,69	17907,61	8,69	91,31
(μm)	(μm)		
		promedio: 7,21	92,78
		mediana: 7,72	92,28

7741M

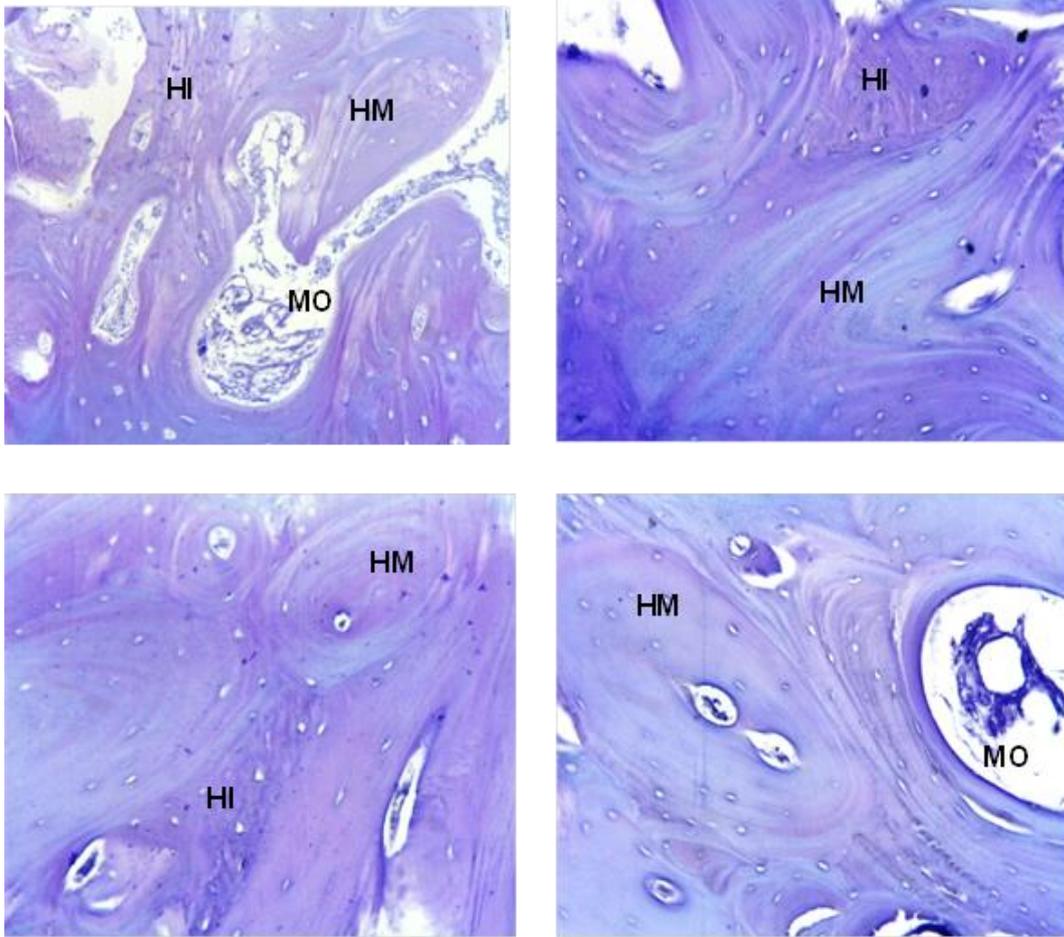
Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
195169,67	15410,72	7,896062949	92,10393705
199924,33	0	0	100
210056,31	8017,64	3,816900335	96,18309967
182640,42	5847,94	3,201887074	96,79811293
183299,73	10135,74	5,52959898	94,47040102
212665,63	25899,54	12,17852645	87,82147355
187234,47	8862,94	4,733604875	95,26639512
151537,44	7581,62	5,003133219	94,99686678
162686,08	13724,04	8,435903059	91,56409694
181726,83	10426,65	5,737540241	94,26245976
(μm)	(μm)		
		promedio: 5,65	94,34
		mediana: 5,26	94,73

7737

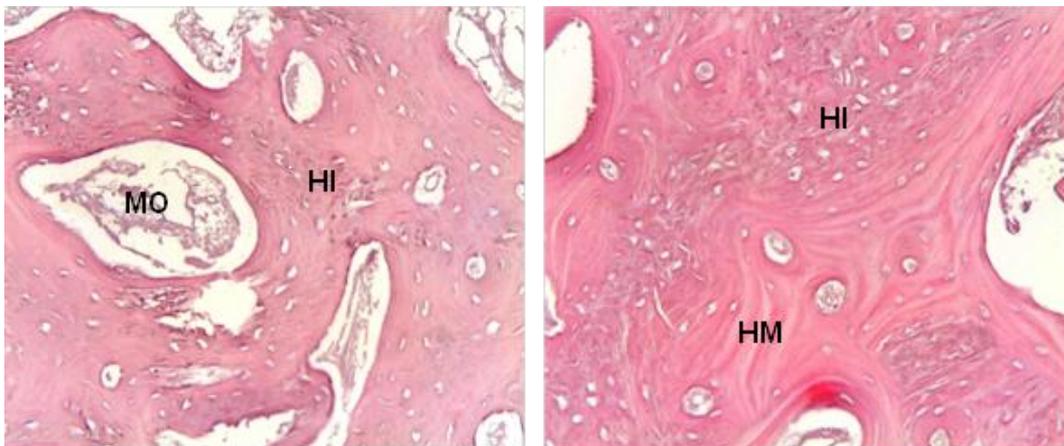
Área total de hueso	Área de hueso inmaduro	% Hueso inmaduro	% Tejido conectivo
197514,13	12061,38	6,11	93,89340904
207692,95	0	0	100
219074,08	10190,25	4,65	95,34849125
218608,42	16883,48	7,72	92,27683911
209716,36	6829,32	3,26	96,74354447
207543,42	0	0	100
217572,53	9977,17	4,59	95,41432459
219032,86	0	0	100
208678,27	1806,24	0,87	99,13443791
187209,77	0	0	100
(μm)	(μm)		
		promedio: 2,72	97,28
		mediana: 2,06	97,93



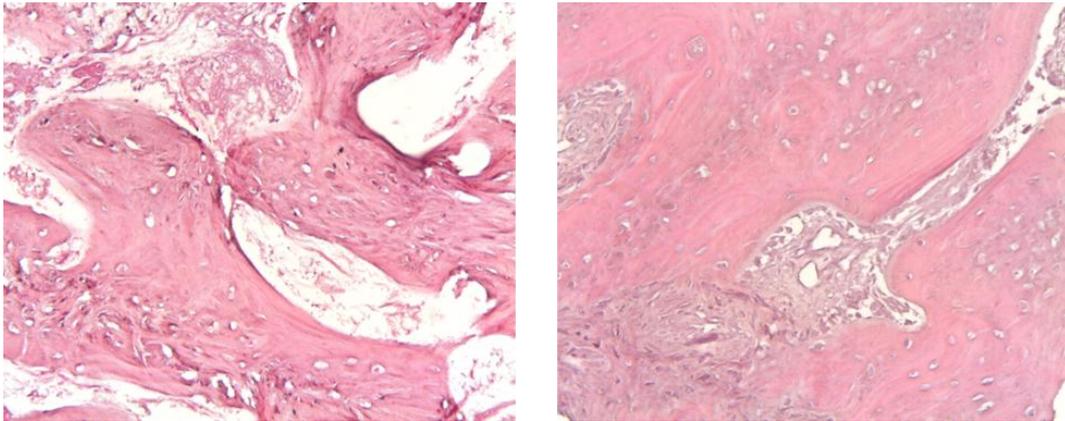
Gráfico 9. Otro osteoinductor. Porcentaje de hueso inmaduro y tejido conectivo a los 60 días.



Figuras 16-19. Flavonoides 30 días (superior izquierda) y 60 días (inferior izquierda). Otro osteoinductor 30 días (superior derecha) y 60 días (inferior derecha). HI: Hueso inmaduro desorganizado. MO: Médula ósea. HM: Hueso maduro organizado. Tinción azul de toluidina.



Figuras 20 y 21. Sin biomaterial 30 días (izquierda) y 60 días (derecha). HI: Hueso inmaduro desorganizado. MO: Médula ósea. HM: Hueso maduro organizado. Tinción hematoxilina-eosina.



Figuras 22 y 23. Sin biomaterial 30 días (izquierda) y 60 días (derecha). Tinción hematoxilina-eosina.

5.1. MICROSCOPIO ÓPTICO

30 días

Los alveolos tratados con flavonoides y el otro osteoinductor ofrecen imágenes caracterizadas por la presencia de hueso neoformado, pero en este caso se pueden observar zonas de tejido mineralizado que se encuentra organizado formando osteonas constituidas por láminas de hueso que se disponen de forma concéntrica alrededor de los conductos de Havers. Este tejido organizado es mucho más evidente en los defectos tratados con el segundo osteoinductor. También aparecen zonas de tejido óseo dispuesto de forma irregular y con altos niveles de celularidad, pero en menor medida que en el grupo de alveolos tratados sin biomaterial. En los defectos tratados con biomateriales como los flavonoides no se evidencian restos de material de regeneración, el cuál ha sido reabsorbido en su totalidad.

Los alveolos tratados sin biomaterial muestran la presencia de gran cantidad de hueso neoformado cubriendo el defecto óseo. Sin embargo, este hueso nuevo es totalmente inmaduro, ofreciendo imágenes caracterizadas por un tejido altamente desorganizado, con elevados índices de celularidad y grandes cavidades medulares.

45 días

Las imágenes del grupo tratado con flavonoides muestran un predominio de hueso neoformado maduro organizado en osteonas y, aunque todavía existen áreas de hueso desorganizado con elevada celularidad, estas zonas son muy pequeñas respecto a la totalidad del tejido óseo. En el caso de los defectos tratados con el segundo osteoinductor, aparecen imágenes

caracterizadas por tejido óseo neoformado maduro en su totalidad y organizado en osteonas.

En el grupo tratado sin biomateriales se observa una mayor organización del hueso neoformado que cubre el defecto óseo, con imágenes que muestran zonas de láminas concéntricas formando osteonas y zonas que todavía presentan hueso inmaduro desorganizado.

60 días

Las imágenes del grupo tratado con flavonoides y los demás grupos estudiados, se caracterizan por presentar tejido óseo completamente maduro formado por osteonas, aunque existen pequeños restos de tejido desorganizado que corresponden a zonas de remodelación ósea.

5.2. ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO

30 días

La histomorfometría muestra un porcentaje de hueso inmaduro para los defectos tratados con flavonoides de $33,18 \pm 3,15$ % con respecto a la totalidad del hueso neoformado, mientras que para los defectos óseos tratados con otro osteoinductor el hueso inmaduro viene representado por un $22,9 \pm 5,91$ %. Además existen diferencias significativas entre ambos materiales y entre cada uno de ellos por separado comparándolos con el $57,40 \pm 2,30$ % del grupo tratado sin ningún biomaterial.

45 días

La histomorfometría muestra un porcentaje de hueso inmaduro para los defectos tratados con flavonoides de un $18,86 \pm 4,6$ %, mientras que para los defectos óseos tratados con otro osteoinductor el hueso inmaduro representa un $9,88 \pm 1,42$ %. El hueso inmaduro del grupo tratado sin biomaterial alcanza un $35,3 \pm 1,23$ %.

Los datos revelan diferencias significativas entre ambos materiales de regeneración y entre cada uno de ellos comparado con el grupo control. Además en los tres grupos existen diferencias significativas con respecto a los datos obtenidos a los 30 días.

60 días

No existen diferencias significativas entre los tres grupos. La histomorfometría muestra un porcentaje de hueso inmaduro para los defectos tratados con flavonoides de $7,61 \pm 3,65$ %, mientras que para los defectos

tratados con otro osteoinductor el hueso inmaduro viene representado por un $6,13 \pm 1,95$ %. El hueso inmaduro del grupo tratado sin biomaterial alcanza un $8,17 \pm 1,31$ %. No obstante, las diferencias sí son significativas comparando estos datos con los obtenidos a los 30 y 45 días.

La tabla I muestra los valores promedio que representan la cantidad de hueso inmaduro con respecto a la totalidad de hueso neoformado, tanto para los grupos tratados con flavonoides y otro osteoinductor como para el grupo tratado sin biomateriales, durante un período de tiempo de 30, 45 y 60 días post extracción.

	Flavonoides (%)	Otro osteoinductor (%)	Sin biomaterial (%)
30 días	$33,18 \pm 3,15^*$	$22,9 \pm 5,91^*$	$57,40 \pm 2,3$
45 días	$18,86 \pm 4,6^*$	$9,88 \pm 1,42^*$	$35,3 \pm 1,23$
60 días	$7,61 \pm 3,65$	$6,13 \pm 1,95^*$	$8,17 \pm 1,31$

Tabla 5. Porcentaje de hueso inmaduro a los 30, 45 y 60 días post extracción. *P < 0.05

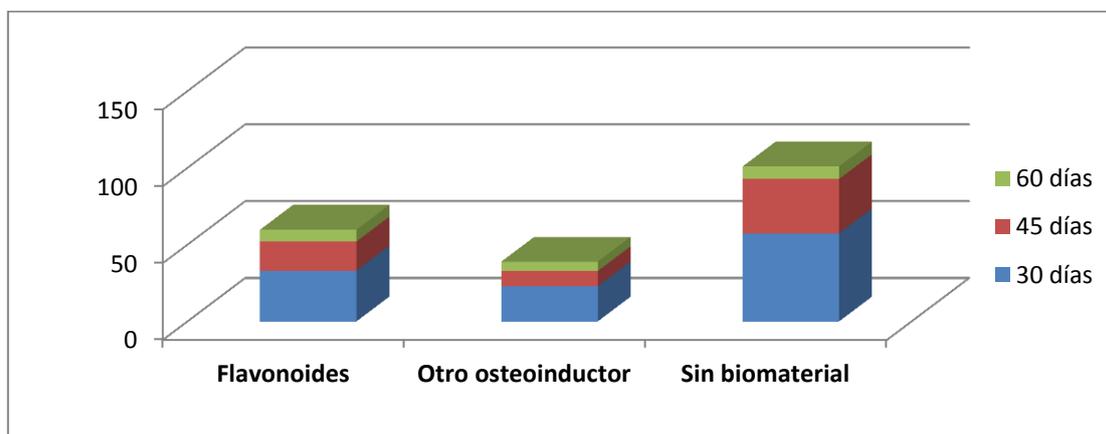


Gráfico 10. Porcentaje de hueso inmaduro a 30, 45 y 60 días post extracción.

5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Descripción del modelo

	Nombre del modelo	MOD_1	
Serie o secuencia	1	FLAVO30	
	2	INDUCTOR30	
	3	CONTROL30	
	Transformación	Ninguna	
	Diferenciación no estacional		0
	Diferenciación estacional		0
	Longitud del periodo estacional	Sin periodicidad	
	Estandarización	Sin aplicar	
Distribución	Tipo	Normal	
	Ubicación	estimado	
	Escala	estimado	
	Método de estimación de los rangos fraccionales	de Blom	
	Rango asignado a los empates	Rango promedio de los valores empatados	

Aplicando las especificaciones del modelo de MOD_1

Resumen del procesamiento de los casos

		FLAVO30	INDUCTOR30	CONTROL30
	Longitud de la serie o secuencia	10	10	10
Número de valores perdidos en el gráfico	Perdidos definidos por el usuario	0	0	0
	Perdidos del sistema	0	0	0

Los casos están sin ponderar.

Parámetros de distribución estimados

		FLAVO30	INDUCTOR30	CONTROL30
Distribución normal	Ubicación	33,1840	22,8960	57,4040
	Escala	3,15259	5,90978	2,30694

Los casos están sin ponderar.

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

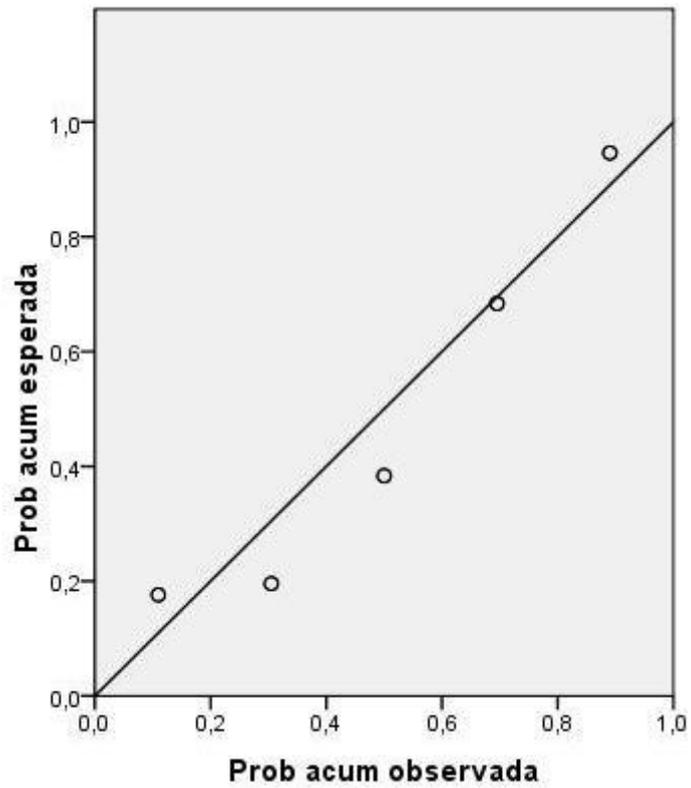


Gráfico 11. Gráfico P –P Normal de FLAVO30.

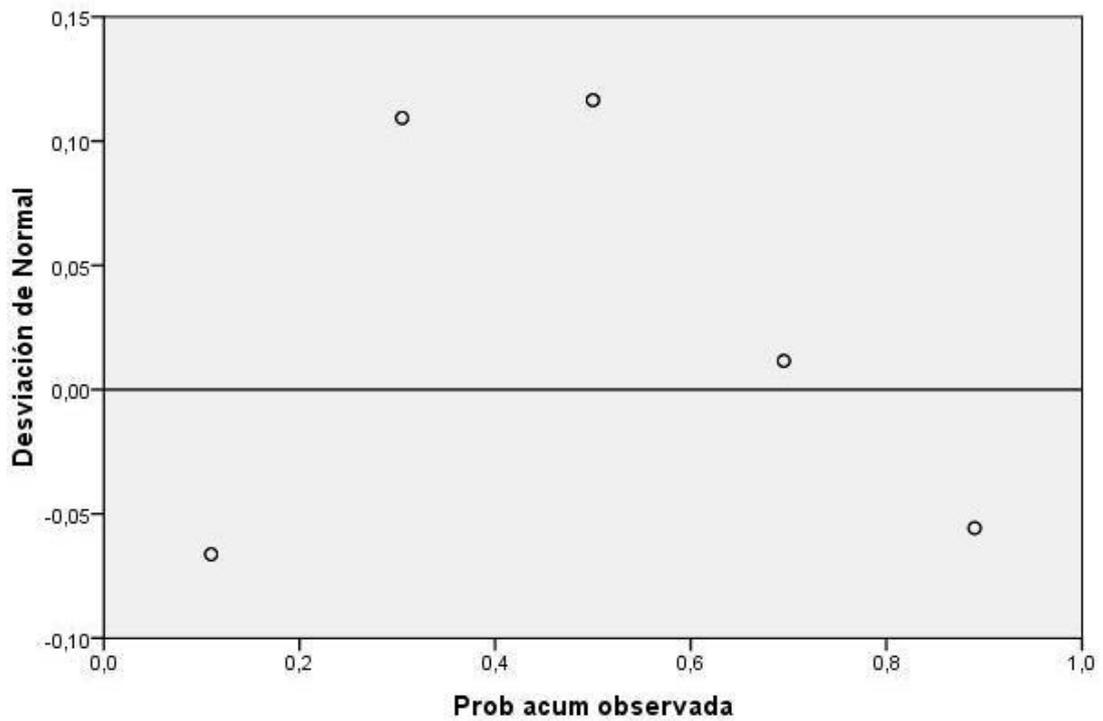


Gráfico 12. Gráfico P –P Normal sin tendencia de FLAVO30.

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

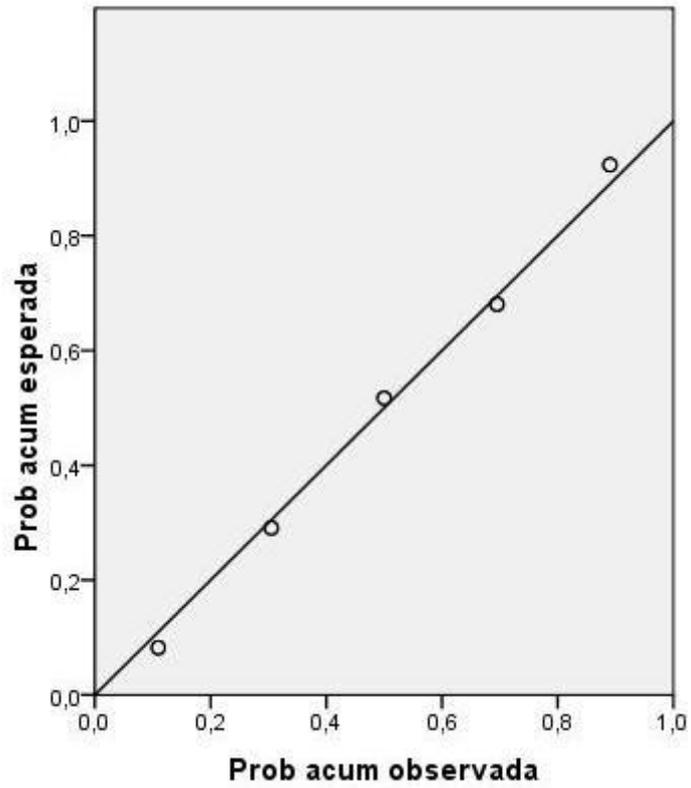


Gráfico 13. Gráfico P –P Normal de INDUCTOR30.

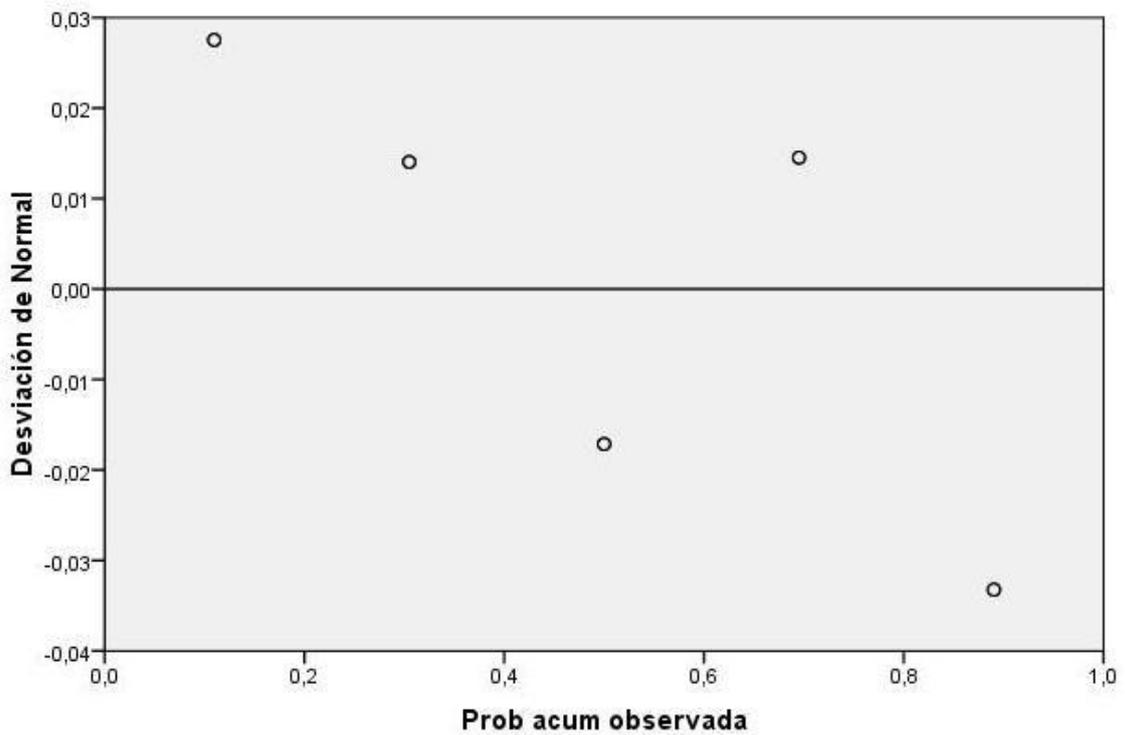


Gráfico 14. Gráfico P –P Normal sin tendencia de INDUCTOR30.

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

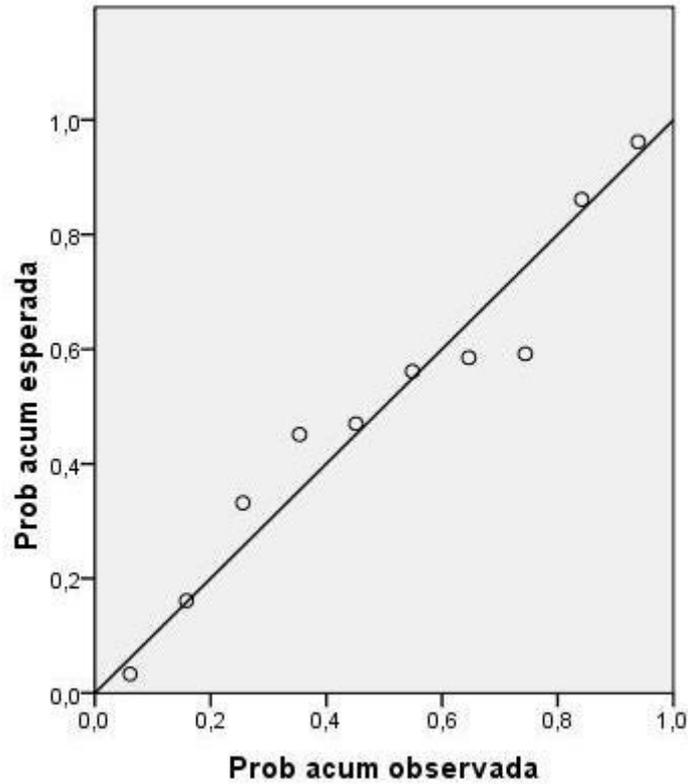


Gráfico 15. Gráfico P –P Normal de CONTROL30.

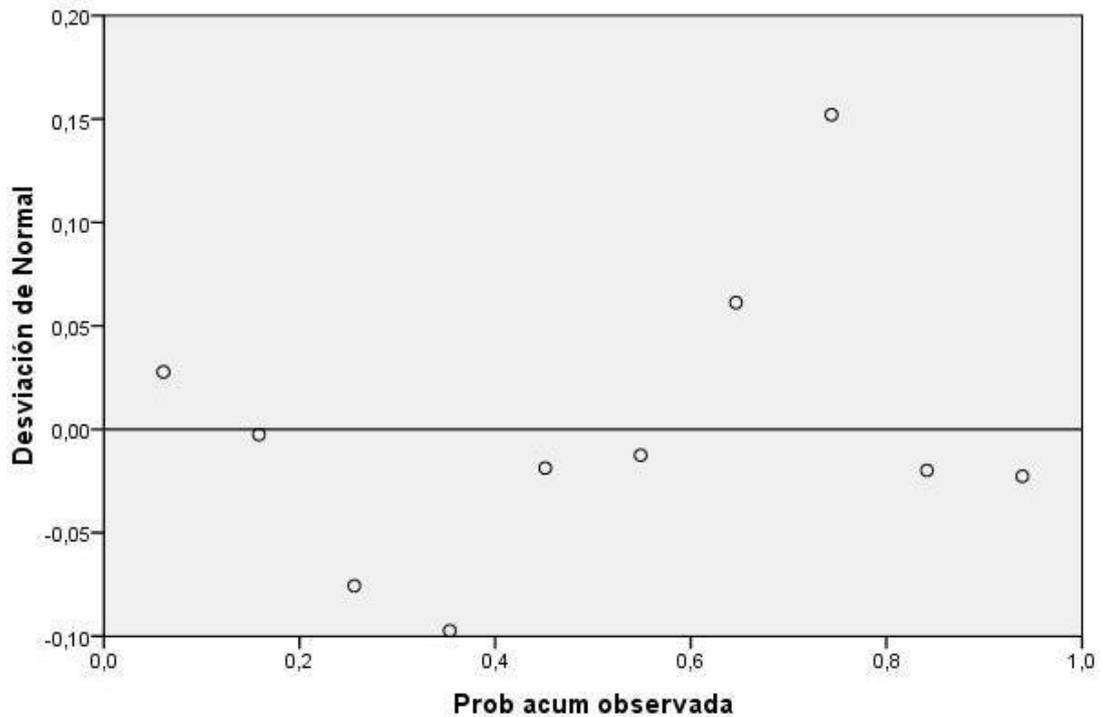


Gráfico 16. Gráfico P –P Normal sin tendencia de CONTROL30.

5.3.1. Frecuencias

Estadísticos

		FLAVO30	INDUCTOR30	CONTROL30	FLAVO45	INDUCTOR45
N	Válidos	10	10	10	10	10
	Perdidos	0	0	0	0	0

Estadísticos

		CONTROL45	FLAVO60	INDUCTOR60	CONTROL60
N	Válidos	10	10	10	10
	Perdidos	0	0	0	0

5.3.2. Tabla de frecuencia

FLAVO30

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	30,25	2	20,0	20,0	20,0
	30,48	2	20,0	20,0	40,0
	32,25	2	20,0	20,0	60,0
	34,69	2	20,0	20,0	80,0
	38,25	2	20,0	20,0	100,0
Total		10	100,0	100,0	

INDUCTOR30

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	14,68	2	20,0	20,0	20,0
	19,64	2	20,0	20,0	40,0
	23,15	2	20,0	20,0	60,0
	25,67	2	20,0	20,0	80,0
	31,34	2	20,0	20,0	100,0
Total		10	100,0	100,0	

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

CONTROL30

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	53,17	1	10,0	10,0	10,0
	55,12	1	10,0	10,0	20,0
	56,40	1	10,0	10,0	30,0
	57,12	1	10,0	10,0	40,0
	57,23	1	10,0	10,0	50,0
	57,76	1	10,0	10,0	60,0
	57,90	1	10,0	10,0	70,0
	57,94	1	10,0	10,0	80,0
	59,91	1	10,0	10,0	90,0
	61,49	1	10,0	10,0	100,0
	Total	10	100,0	100,0	

FLAVO45

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	14,47	2	20,0	20,0	20,0
	14,51	2	20,0	20,0	40,0
	17,50	2	20,0	20,0	60,0
	22,56	2	20,0	20,0	80,0
	25,30	2	20,0	20,0	100,0
	Total	10	100,0	100,0	

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

INDUCTOR45

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	8,34	2	20,0	20,0	20,0
	8,72	2	20,0	20,0	40,0
	9,37	2	20,0	20,0	60,0
	11,41	2	20,0	20,0	80,0
	11,54	2	20,0	20,0	100,0
Total		10	100,0	100,0	

CONTROL45

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	33,62	2	20,0	20,0	20,0
	34,40	2	20,0	20,0	40,0
	35,48	2	20,0	20,0	60,0
	36,14	2	20,0	20,0	80,0
	36,87	2	20,0	20,0	100,0
Total		10	100,0	100,0	

FLAVO60

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	3,31	2	20,0	20,0	20,0
	4,23	2	20,0	20,0	40,0
	7,52	2	20,0	20,0	60,0
	11,29	2	20,0	20,0	80,0
	11,69	2	20,0	20,0	100,0
Total		10	100,0	100,0	

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

INDUCTOR60

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	2,72	2	20,0	20,0	20,0
	5,65	2	20,0	20,0	40,0
	7,22	2	20,0	20,0	60,0
	7,48	2	20,0	20,0	80,0
	7,63	2	20,0	20,0	100,0
	Total	10	100,0	100,0	

CONTROL60

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	5,87	2	20,0	20,0	20,0
	7,91	2	20,0	20,0	40,0
	8,74	2	20,0	20,0	60,0
	9,00	2	20,0	20,0	80,0
	9,33	2	20,0	20,0	100,0
	Total	10	100,0	100,0	

5.3.3. Histograma

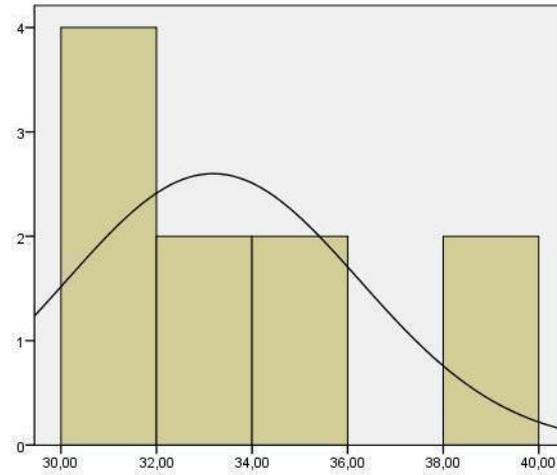


Gráfico 17. Histograma FLAVO30. Media = 33,18. Desviación típica = 3,153. N=10.

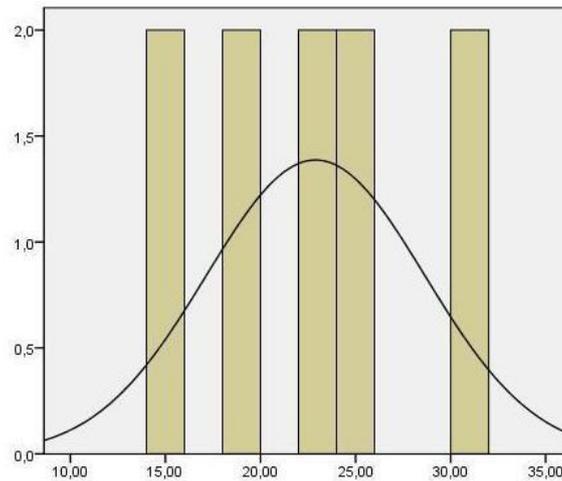


Gráfico 18. Histograma INDUCTOR30. Media = 22,90. Desviación típica = 5,91. N=10.

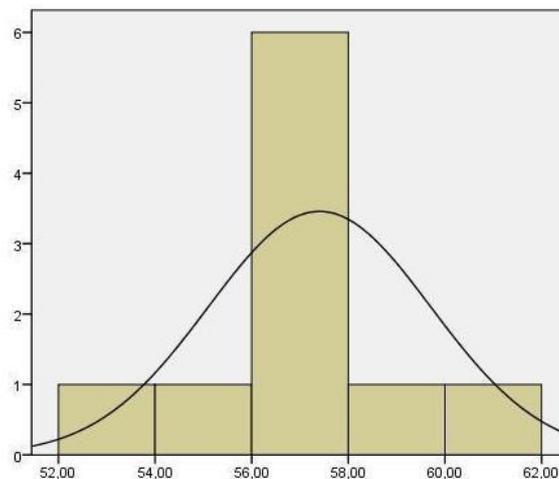


Gráfico 19. Histograma CONTROL30. Media = 57,40. Desviación típica = 2,307. N=10.

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

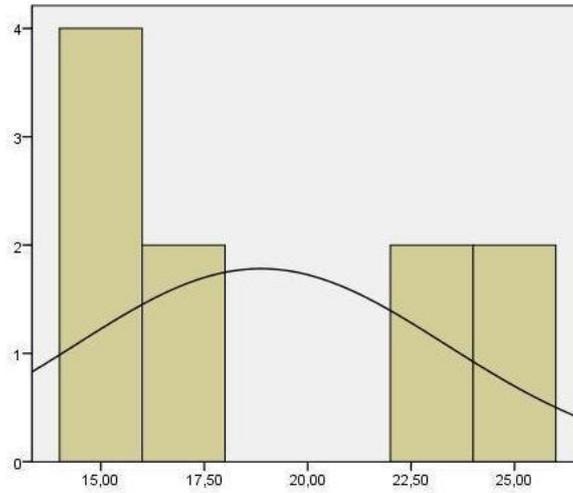


Gráfico 20. Histograma FLAVO45. Media = 18,87. Desviación típica = 4,60. N=10.

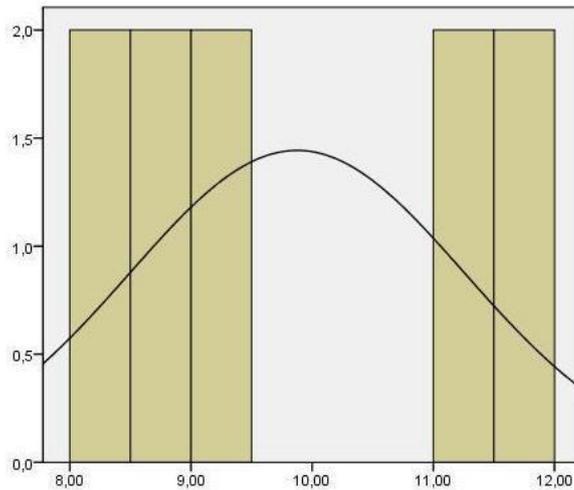


Gráfico 21. Histograma INDUCTOR45. Media = 9,88. Desviación típica = 1,42. N=10.

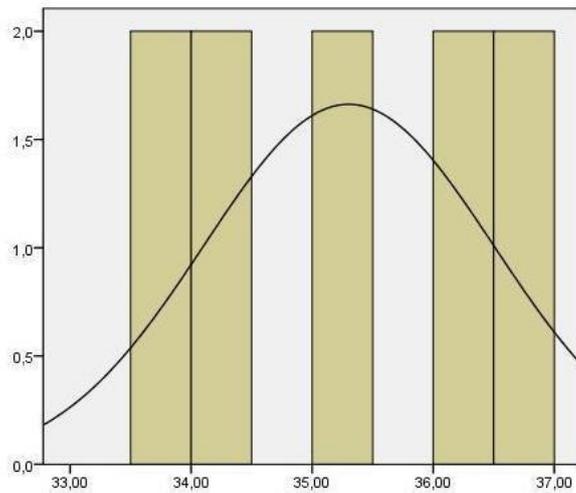


Gráfico 22. Histograma CONTROL45. Media = 35,30. Desviación típica = 1,232. N=10.

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

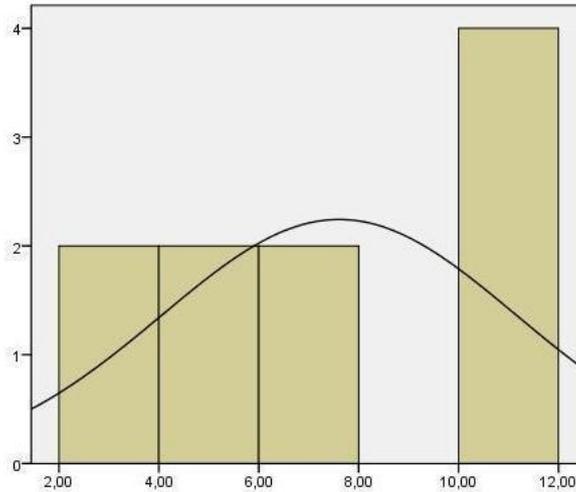


Gráfico 23. Histograma FLAVO60. Media = 7,61. Desviación típica = 3,655. N=10.

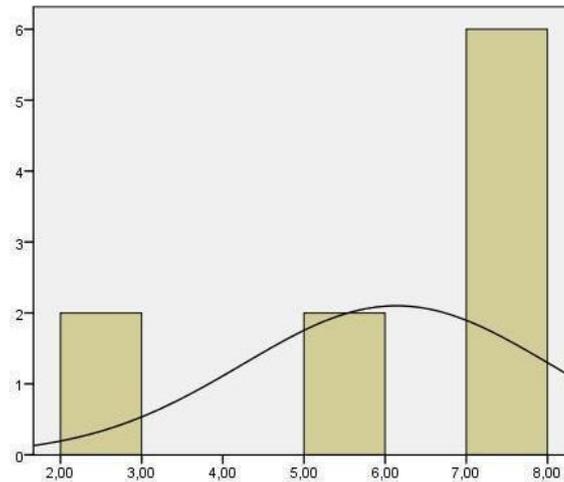


Gráfico 24. Histograma INDUCTOR60. Media = 6,14. Desviación típica = 1,95. N=10.

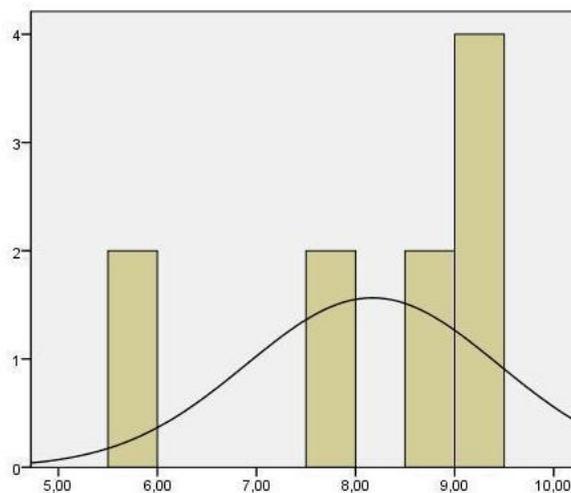


Gráfico 25. Histograma CONTROL60. Media = 8,17. Desviación típica = 1,31. N=10.

5.3.4. Prueba T

Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típica	Error típico de la media
Par 1	CONTROL30	57,4040	10	2,30694	,72952
	FLAVO30	33,1840	10	3,15259	,99694
Par 2	INDUCTOR30	22,8960	10	5,90978	1,86884
	CONTROL30	57,4040	10	2,30694	,72952
Par 3	MELATO30	22,8960	10	5,90978	1,86884
	FLAVO30	33,1840	10	3,15259	,99694
Par 4	INDUCTOR45	35,3020	10	1,23246	,38974
	FLAVO45	18,8680	10	4,59970	1,45455
Par 5	CONTROL45	35,3020	10	1,23246	,38974
	INDUCTOR45	9,8760	10	1,41999	,44904
Par 6	FLAVO45	18,8680	10	4,59970	1,45455
	INDUCTOR45	9,8760	10	1,41999	,44904
Par 7	CONTROL60	8,1700	10	1,30954	,41411
	FLAVO60	7,6080	10	3,65487	1,15577
Par 8	CONTROL60	8,1700	10	1,30954	,41411
	INDUCTOR60	6,1400	10	1,95042	,61678
Par 9	FLAVO60	7,6080	10	3,65487	1,15577
	INDUCTOR60	6,1400	10	1,95042	,61678
Par 10	FLAVO30	33,1840	10	3,15259	,99694
	FLAVO45	18,8680	10	4,59970	1,45455
Par 11	FLAVO30	33,1840	10	3,15259	,99694
	FLAVO60	7,6080	10	3,65487	1,15577
Par 12	FLAVO45	18,8680	10	4,59970	1,45455
	FLAVO60	7,6080	10	3,65487	1,15577
Par 13	INDUCTOR30	22,8960	10	5,90978	1,86884
	INDUCTOR45	9,8760	10	1,41999	,44904
Par 14	INDUCTOR30	22,8960	10	5,90978	1,86884
	INDUCTOR60	6,1400	10	1,95042	,61678
Par 15	INDUCTOR45	9,8760	10	1,41999	,44904
	INDUCTOR60	6,1400	10	1,95042	,61678

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

Correlaciones de muestras relacionadas

		N	Correlación	Sig.
Par 1	CONTROL30 y FLAVO30	10	-,402	,250
Par 2	INDUCTOR30 y CONTROL30	10	-,466	,175
Par 3	INDUCTOR30 y FLAVO30	10	,936	,000
Par 4	CONTROL45 y FLAVO45	10	,237	,510
Par 5	CONTROL45 y INDUCTOR45	10	,357	,312
Par 6	FLAVO45 y INDUCTOR45	10	,982	,000
Par 7	CONTROL60 y FLAVO60	10	-,805	,005
Par 8	CONTROL60 y INDUCTOR60	10	-,593	,071
Par 9	FLAVO60 y INDUCTOR60	10	,848	,002
Par 10	FLAVO30 y FLAVO45	10	,982	,000
Par 11	FLAVO30 y FLAVO60	10	,899	,000
Par 12	FLAVO45 y FLAVO60	10	,958	,000
Par 13	INDUCTOR30 y INDUCTOR45	10	,865	,001
Par 14	INDUCTOR30 y INDUCTOR60	10	,612	,060
Par 15	INDUCTOR45 y INDUCTOR60	10	,787	,007

Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas		
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	CONTROL30 - FLAVO30	24,22000	4,59394	1,45273
Par 2	INDUCTOR30 - CONTROL30	-34,50800	7,27669	2,30109
Par 3	INDUCTOR30 - FLAVO30	-10,28800	3,15932	,99906
Par 4	CONTROL45 - FLAVO45	16,43400	4,47137	1,41397
Par 5	CONTROL45 - INDUCTOR45	25,42600	1,51224	,47821
Par 6	FLAVO45 - INDUCTOR45	8,99200	3,21723	1,01738
Par 7	CONTROL60 - FLAVO60	,56200	4,77234	1,50915
Par 8	CONTROL60 - INDUCTOR60	2,03000	2,92402	,92466
Par 9	FLAVO60 - INDUCTOR60	1,46800	2,25088	,71179
Par 10	FLAVO30 - FLAVO45	14,31600	1,61327	,51016
Par 11	FLAVO30 - FLAVO60	25,57600	1,60428	,50732
Par 12	FLAVO45 - FLAVO60	11,26000	1,51462	,47897
Par 13	INDUCTOR30 - INDUCTOR45	13,02000	4,73487	1,49730
Par 14	INDUCTOR30 - INDUCTOR60	16,75600	4,96241	1,56925
Par 15	INDUCTOR45 - INDUCTOR60	3,73600	1,20889	,38228

Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas	
		95% Intervalo de confianza para la diferencia	
		Inferior	Superior
Par 1	CONTROL30 - FLAVO30	20,93369	27,50631
Par 2	INDUCTOR30 - CONTROL30	-39,71343	-29,30257
Par 3	INDUCTOR30 - FLAVO30	-12,54804	-8,02796
Par 4	CONTROL45 – FLAVO45	13,23538	19,63262
Par 5	CONTROL45 – INDUCTOR45	24,34421	26,50779
Par 6	FLAVO45 – INDUCTOR45	6,69053	11,29347
Par 7	CONTROL60 – FLAVO60	-2,85193	3,97593
Par 8	CONTROL60 – INDUCTOR60	-,06172	4,12172
Par 9	FLAVO60 – INDUCTOR60	-,14218	3,07818
Par 10	FLAVO30 – FLAVO45	13,16193	15,47007
Par 11	FLAVO30 – FLAVO60	24,42837	26,72363
Par 12	FLAVO45 – FLAVO60	10,17650	12,34350
Par 13	INDUCTOR30 – INDUCTOR45	9,63288	16,40712
Par 14	INDUCTOR30 – INDUCTOR60	13,20611	20,30589
Par 15	INDUCTOR45 – INDUCTOR60	2,87122	4,60078

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

Prueba de muestras relacionadas

		t	gl	Sig. (bilateral)
Par 1	CONTROL30 - FLAVO30	16,672	9	,000
Par 2	INDUCTOR30 - CONTROL30	-14,996	9	,000
Par 3	INDUCTOR30 - FLAVO30	-10,298	9	,000
Par 4	CONTROL45 – FLAVO45	11,623	9	,000
Par 5	CONTROL45 – INDUCTOR45	53,169	9	,000
Par 6	FLAVO45 – INDUCTOR45	8,838	9	,000
Par 7	CONTROL60 – FLAVO60	,372	9	,718
Par 8	CONTROL60 – INDUCTOR60	2,195	9	,056
Par 9	FLAVO60 – INDUCTOR60	2,062	9	,069
Par 10	FLAVO30 – FLAVO45	28,062	9	,000
Par 11	FLAVO30 – FLAVO60	50,414	9	,000
Par 12	FLAVO45 – FLAVO60	23,509	9	,000
Par 13	INDUCTOR30 – INDUCTOR45	8,696	9	,000
Par 14	INDUCTOR30 – INDUCTOR60	10,678	9	,000
Par 15	INDUCTOR45 – INDUCTOR60	9,773	9	,000

6. DISCUSIÓN

Con el presente estudio nos propusimos evaluar osteogénesis producida por un flavonoide (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*) en el proceso de cicatrización de alveolos post extracción a los 30, 45 y 60 días desde la primera intervención. El biomaterial fue colocado únicamente en alveolos mandibulares, seleccionados previamente, de nueve perros American Fox Hound (**Cutando, 2007; Park, 2007; Fickl, 2008; Guardia, 2011**). El motivo de optar por el perro de esta raza es debido a la similitud que ofrece con respecto a la cresta alveolar humana, siendo su manejo más sencillo y económico comparado con otros modelos animales más evolucionados filogenéticamente.

Todos los perros de nuestro estudio fueron macho, porque los estrógenos de las hembras podían producir alteraciones en los resultados, ya que éstos influyen en el remodelado óseo como comentábamos en la introducción (**Roggia, 2001**). Los estrógenos tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo: por un lado favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos y por otro, disminuyen la reabsorción osteoclástica.

La importancia de probar un nuevo flavonoide natural, a modo de biomaterial, como alternativa a los sustitutos óseos presentes en el mercado, se debe a que cada vez más se publican estudios que tratan de acelerar el proceso de cicatrización ósea para tratar los casos de atrofia maxilar con la aplicación de factores de crecimiento (**Amerio, 2010**) y hormonas (**Calvo-Guirado, 2014**), pero aún no se ha encontrado el sustituto ideal para competir con las ventajas del hueso autólogo, minimizando todos sus inconvenientes descritos en la introducción.

Numerosos estudios *in vitro* han referido que los flavonoides son importantes mediadores en la estimulación y formación ósea, promoviendo la diferenciación osteoblástica e inhibiendo la osteoclastogénesis (**Jeong, 2005; Benavente-García, 2008; Kim, 2013**).

En el reciente estudio, hemos comprobado el incremento en la formación de nuevo hueso estimulado por flavonoides a estadios tempranos con una mayor producción y diferenciación celular en la zona cortical que acelera considerablemente la síntesis y mineralización de la matriz ósea. Además, los flavonoides disminuyen la reabsorción ósea ya que, debido a sus propiedades antioxidantes, actúan sobre los osteoclastos inhibiendo las señales moleculares encargadas de promover su diferenciación (**Bandyopadhyay, 2006; Goto, 2014**).

Cuando se analiza con el microscopio óptico los cortes histológicos obtenidos de los alveolos post extracción tratados con flavonoides, se observa claramente la regeneración ósea con formación de nuevo hueso mineralizado. No obstante, este hueso mineralizado necesita un período de tiempo para organizarse y constituir un hueso laminar completamente maduro. El porcentaje de hueso inmaduro respecto a la totalidad de hueso regenerado, constituye un indicador de la capacidad que presentan los flavonoides para estimular y acelerar el proceso de maduración ósea en estadios tempranos.

Los resultados preliminares de este estudio (**Tabla 5; Gráfico 11**) muestran que el porcentaje de hueso inmaduro para los flavonoides va disminuyendo progresivamente tras 30, 45 y 60 días desde su colocación dentro del alveolo. Esto indica que se ha desarrollado la formación y maduración ósea en un breve período de tiempo, obteniendo finalmente una regeneración ósea temprana. Sin embargo, el tiempo requerido con los flavonoides es ligeramente mayor en términos de maduración ósea si lo comparamos con los resultados obtenidos por el otro osteoinductor, si bien es cierto que estas discrepancias no sugieren un amplio rango de variabilidad entre ambos biomateriales.

No obstante, nuestros resultados corresponden al análisis de un número reducido de muestras, lo que significa que no es posible ofrecer resultados concluyentes acerca de la comparación entre los flavonoides y el otro osteoinductor. Como la muestra es demasiado pequeña, no es posible determinar si las pequeñas diferencias encontradas entre ambos biomateriales pueden llegar a ser o no significativas.

BASES MOLECULARES DEL METABOLISMO ÓSEO

Osteoblastos

En una primera fase la diferenciación de los osteoblastos es controlada tanto por el factor de transcripción Cbfa1/Runx2 como por las BMPs. Estos son los primeros indicadores de la diferenciación osteogénica ya que dan lugar a la transformación de una célula madre mesenquimal pluripotencial, en una célula osteoprogenitora.

Estos precursores expresan marcadores específicos en la membrana celular para ejercer su acción, de modo que en estas células osteoprogenitoras tiene lugar la expresión del polipéptido α -1 del colágeno tipo 1 (COL1A1) y de la osteopontina (OPN), que regulan la proliferación y diferenciación de estas células hacia preosteoblastos.

Posteriormente, por un mecanismo similar, tiene lugar la expresión de la fosfatasa alcalina y sialoproteína ósea que participan en la diferenciación hacia osteoblastos para conseguir la maduración de la matriz ósea. La osteocalcina junto con la osteopontina son marcadores osteogénicos en las fases finales de la diferenciación osteoblástica y regulan la mineralización del tejido óseo, dando lugar finalmente a la diferenciación de los osteoblastos en osteocitos o células de revestimiento (**Fernández-Tresguerres, 2006**).

Osteoclastos

La reabsorción ósea tiene lugar mediante complejas interacciones entre los osteoclastos y otras células presentes en el hueso. Dicha regulación se produce actuando sobre el número de osteoclastos o sobre su capacidad de reabsorción. Las células medulares progenitoras, osteoblastos, macrófagos y linfocitos T están presentes en el microambiente de los osteoclastos. Todas ellas, incluyendo los osteoclastos, producen citoquinas y factores de crecimiento que producen efecto sobre la formación y/o actividad osteoclástica (**Mundy, 1993**).

En la osteoclastogénesis, el factor estimulante de la colonia de macrófagos (M-CSF) es requerido en fases tempranas para la formación de células gigantes multinucleadas a partir de células madre hematopoyéticas de la médula ósea (precursoras de macrófagos y monocitos). No obstante, la regulación de la osteoclastogénesis está basada en 3 llaves moleculares:

- Osteoprotegerina, una proteína soluble sintetizada por los osteoblastos y preosteoblastos.
- RANKL, un ligando situado en la superficie de los osteoblastos y preosteoblastos, y
- RANK, un receptor situado en la membrana de osteoclastos y preosteoclastos.

La interacción RANKL/RANK inicia la diferenciación y actividad osteoclástica, incrementando la reabsorción. Sin embargo, en presencia de osteoprotegerina, la unión de ésta con el RANKL inhibe la unión de este ligando a su receptor RANK y por tanto se inhibe la diferenciación osteoclástica (**Simonet, 1997; Lacey, 1998; Burgess, 1999**).

Además, existen numerosos factores humorales de acción local que ejercen algún efecto sobre la reabsorción ósea. Entre las citoquinas que inducen aumentos de la reabsorción se encuentran la IL-1, IL-6, IL-7, IL-11, IL-17 y el TNF- α . Por el contrario, otras como la IL-4, la IL-10 o el IFN- γ , ejercen un efecto inhibitorio (**Riancho, 2003**).

FLAVONOIDES Y EL METABOLISMO ÓSEO

Está demostrado que los flavonoides poseen actividades reguladoras a nivel biológico. Dado que sus principales efectos se ejercen sobre células sanguíneas y endoteliales a nivel microvascular, no resulta sorprendente que presenten propiedades antiinflamatorias, antitumorales y actúen como protectores a nivel cardiovascular (**Benavente-García, 2008**). En cuanto a sus efectos a nivel óseo, numerosos estudios se han centrado en la ipriflavona (**Sukmanskii, 2002; Minegishi, 2002; Maki, 2005; Ito, 2007**), sin embargo, se ha documentado que la apigenina (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-

benzopyrone) posee efectos protectores sobre la pérdida ósea en ratas ovariectomizadas (**Park, 2008; Siddiqui, 2010**). Además, diversos autores demuestran que la apigenina actúa a nivel óseo aumentando la diferenciación osteoblástica (**Choi, 2007**) y disminuyendo la función de los osteoclastos (**Bandyopadhyay, 2006**).

En nuestro estudio, el flavonoide (5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone) muestra un incremento significativo en la velocidad de maduración ósea si lo comparamos con los resultados obtenidos en los alveolos post extracción tratados sin biomaterial.

Efectos a nivel osteoblástico

Los flavonoides aumentan significativamente la proliferación y diferenciación de los osteoblastos. Estos efectos se deben a la capacidad de la apigenina para unirse a los receptores de estrógenos. Por su estructura, la apigenina se asemeja a ellos, de ahí su relativa adhesión a los receptores estrogénicos tipo α y β , aunque con mayor afinidad hacia los segundos. Esta preferencia para ligarse con los receptores tipo β llevará consigo una mayor actividad de transcripción sobre aquellos tejidos en que los receptores β estén presentes en cantidades relevantes, tales como en los osteoblastos del hueso, el sistema nervioso central y el endotelio vascular.

La apigenina, de modo análogo al β -estradiol, aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina, un marcador temprano de la diferenciación osteoblástica, y aumenta la expresión génica de la osteocalcina en estas células, un marcador más tardío de diferenciación osteoblástica (**Mak, 2006; Siddiqui, 2010**). Además, la actividad osteogénica de la apigenina es provocada por la estimulación de la producción de células osteoprogenitoras en la médula ósea mediante la expresión génica de proteínas BMP-2 y BMP-6, y mediante la expresión del polipéptido $\alpha 1$ del colágeno tipo I (COL1A1) necesario para la diferenciación de estas células (**Bandyopadhyay, 2006; Siddiqui, 2010**).

Efectos a nivel osteoclástico

Los flavonoides inhiben el TNF- α que induce la secreción de varias citoquinas osteoclastogénicas por parte de la línea celular osteoblástica. El TNF- α induce la producción de IL-6, RANTES (regulador de la expresión, secreción y activación de células T) y MCP-1 y MCP-3. Por otra parte, incrementa la producción de IFN γ , que estimula la secreción de monoquinas, CXCL-9 y CXCL-10 en los osteoblastos. Estas citoquinas inflamatorias contribuyen a la osteoclastogénesis por estimular a osteoblastos, fibroblastos y células T activadas para producir RANKL, que a su vez induce la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea (**Shigeyama, 2000; Bandyopadhyay, 2006; Choi, 2007**).

De forma similar, los flavonoides inhiben la expresión de marcadores de la diferenciación osteoclástica como la fosfatasa ácida tártrato-resistente (TRAP), el receptor activador del factor nuclear kappa (RANK) y el receptor de calcitonina, lo que provoca la inhibición de la formación de osteoclastos multinucleados (**Siddiqui, 2010**). Esta inhibición tiene lugar incluso en células precursoras osteoclásticas obtenidas de la médula ósea de ratones, después del tratamiento con RANKL y con el factor estimulante de la colonia de macrófagos (MCSF) (**Park, 2008; Choi, 2009**).

7. CONCLUSIONES

El uso de flavonoides a modo de biomaterial en alveolos post extracción muestra bajos porcentajes de hueso inmaduro en los estadios tempranos, por lo que se deduce que aceleran el proceso de maduración y regeneración ósea.

El número de osteoblastos presentes en las muestras de alveolos tratados con flavonoides es mucho mayor comparado con los alveolos tratados sin biomaterial. La diferenciación celular comienza mucho antes en los alveolos tratados con flavonoides comparado con los alveolos tratados sin biomaterial y el resultado es un aumento en la síntesis y organización de matriz osteoide mineralizada en estadios tempranos.

Los alveolos tratados con flavonoides presentan una menor reabsorción ósea, debida a la inhibición osteoclástica, con lo que proporciona un hueso de mayor calidad en las zonas tratadas con este biomaterial.

Con respecto al otro osteoinductor utilizado, los flavonoides presentan un aumento poco significativo de hueso inmaduro, lo que significa que, si bien aceleran la cicatrización ósea con respecto a los alveolos tratados sin biomaterial, el proceso es ligeramente más lento que con el otro osteoinductor. No obstante los resultados no son determinantes como para confirmar que esas mínimas diferencias son significativas como para descartar el uso de los flavonoides, en beneficio del otro osteoinductor, si buscamos una regeneración más rápida que nos permita reducir el período de espera previo a la colocación de implantes osteointegrados. Todavía desconocemos por qué los flavonoides son menos potentes, desde el punto de vista de rapidez regenerativa, comparándolos con el otro osteoinductor.

Dado el relativamente pequeño tamaño de la muestra objeto del estudio, sería interesante extrapolar el diseño a un mayor número de animales de experimentación, incluso de distinta especie, con el fin de comparar los resultados que se obtengan. Por lo tanto, y dado que los flavonoides se postulan como un biomaterial bastante prometedor, confirmamos que son necesarias más investigaciones al respecto.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE y cols. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 4184-8.
2. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 2002 Jan;18(1):75-81.
3. Ali F, Rahul, Naz F, Jyoti S, Siddique YH. Protective effect of apigenin against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in albino rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014 Jun;767:13-20.
4. Al-Jubouri HHF, Al-Jalil BH, Farid I, Jasim F, Wehbi S. 1990. The effect of chamomile on hyperlipidemias in rats. *J Fac Med Baghdad* 32: 5 –11.
5. Allegrini Jr. S, Koenig Jr. B, Rivellino M, Yoshimoto M, Gedrange T, Fanghaenel J et al. Alveolar ridge sockets preservation with bone grafting – review. *Annales academiae medica estetinensis*. 2008; 54 (1): 70–81.
6. Amani R, Moazen S, Shahbazian H, Ahmadi K, Jalali MT. Flavonoid-rich beverage effects on lipid profile and blood pressure in diabetic patients. *World J Diabetes*. 2014 Dec 15;5(6):962-8.
7. Amerio P, Vianale G, Reale M, Muraro R, Tulli A, Piattelli A. The effect of deproteinized bovine bone on osteoblast growth factors and proinflammatory cytokine production. *Clin Oral Impl Res*. 2010; 21: 650–5.
8. Amin I, Koh BK, Asmah R. Effect of cacao liquor extract on tumor marker enzymes during chemical hepatocarcinogenesis in rats. *J. Med. Food* 2004; 7: 7-2.
9. Amler MH. The time sequence of Tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1969; 27(3): 309-18.
10. An H, Yu Y, Zhang M, Xu H, Qi R, Yan X, Liu S, Wang W, Guo Z, Guo J. 2002. Involvement of ERK, p38 and NF- κ B signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* 106:38–45.

11. Anitua E. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (P.R.G.F.) Vitoria: Puesta al día Publicaciones S.L; 2000.
12. Antunes AA, Oliveira Neto P, de Santis E, Caneva M, Botticelli D, Salata LA. Comparisons between Bio-Oss(®) and Straumann(®) Bone Ceramic in immediate and staged implant placement in dogs mandible bone defects. Clin Oral Implants Res. 2013 Feb;24(2):135-42.
13. Arango D, Diosa-Toro M, Rojas-Hernandez LS, Schwartz JL, Mo X, Jiang J, Schmittgen TD, Doseff AI. Dietary apigenin reduces LPS-induced expression of miR-155 restoring immune balance during inflammation. Mol Nutr Food Res. 2015 Jan 16.
14. Araujo M, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. J Clin Periodontol. 2005;32: 212-8.
15. Araya, J. Estudio morfológico comparativo de un hueso liofilizado fabricado en Chile y de un hueso comercial (Bio-oss). Tesis para optar el título de cirujano dentista. Chile: Universidad de Chile; 2006.
16. Arenaz-Búa J, Luaces-Rey R, Sironvalle-Soliva S, Otero-Rico A, Charro-Huerga E, Patiño-Seijas B, García-Rozado A, Ferreras-Granados J, Vázquez-Mahía I, Lorenzo-Franco F, Martín-Sastre R, López-Cedrún JL. A comparative study of platelet-rich plasma, hydroxyapatite, demineralized bone matrix and autologous bone to promote bone regeneration after mandibular impacted third molar extraction. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010 May 1;15(3):e483-9.
17. Arts IC, Hollman PC, Kromhout D. Chocolate as a source of tea flavonoids. Lancet. 1999 Aug 7;354(9177):488.
18. Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. J Periodontol. 2000; 71 (6): 1015-23.
19. Aubin JE, Triffitt JT. Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan G, editors. Principles of bone biology. 2nd ed, San Diego: Academic Press; 2002. p. 59–81.
20. Avallone R, Zanolli P, Puia G, Kleinschnitz M, Schreier P, Baraldi M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from Matricaria chamomilla. Biochem Pharmacol. 2000 Jun 1;59(11):1387-94.

21. Baar AZ, Ibañez AL. Injertos y substitutos óseos, y sustancias osteoinductivas: puesta al día. *Rev Chilena Ortop y Traum.* 2006; 47: 23-32.
22. Baladrón J, Junquera LM, Clavero A, Clavero B. Injertos óseos en cirugía implantológica: aspectos generales. Principios y fundamentos. *Rev Esp Cir Oral Maxilofac.* 2001; 23: 135-43.
23. Baliga MS, Rao S. Radioprotective potential of mint: a brief review. *J Cancer Res Ther.* 2010;6(3):255-62.
24. Bandyopadhyay S, Lion JM, Mentaverri R, Ricupero DA, Kamel S, Romero JR, Chattopadhyay N. Attenuation of osteoclastogenesis and osteoclast function by apigenin. *Biochem Pharmacol.* 2006 Jul 14;72(2):184-97.
25. Barbosa PAL, Limeira J FA, Márquez GME, Pedreira RLM, Marzola C, Carneiro PEA, et al. Effect of 830-nm Laser Light on the Repair of Bone Defects Grafted with Inorganic Bovine Bone and Decalcified Cortical Osseus Membrane. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery.* 2003; 21(5): 301-306.
26. Bartee B. Extraction site reconstruction for alveolar ridge preservation. Part 1: Rationale and materials selection. Part 2: Membrane assisted surgical technique. *J Oral Implant.* 2001; 27: 187-97.
27. Beck T, Mealey B. Histologic Analysis of Healing After Tooth Extraction With Ridge Preservation Using Mineralized Human Bone Allograft. *J Periodontol.* 2010; 81: 1765–72.
28. Becker W, Lynch SLU, Becker B, Caffesse R, Donath K, Sanchez R. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with Platelet-Derived Growth Factors and Insulin- Like Growth Factor-I or Demineralized Freeze- Dried Bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol.* 1992; 63: p. 929-940.
29. Becker W, Becker B, Caffesse R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. *J Periodontol.* 1994 Dec; 65(12): p. 1128-33.
30. Becker W, Schenk R, Higuchi K, Lekholm U, Becker B. Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: a study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995 Mar-Apr; 10(2): p. 143-54.

31. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr.* 2003 Oct;133(10):3248S-3254S.
32. Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem.* 2008 Aug 13;56(15):6185-205.
33. Beretta M, Cicciù M, Bassi G, Rancitelli D, Poli P, Grossi GB, Maiorana C. A retrospective evaluation of 192 implants placed in augmented bone: a six-year mean follow-up study. *J Oral Implantol.* 2015 Feb 16.
34. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1997 Apr;8(2):117-24.
35. Bernabeu MF, Lopez-Oliva MF, Larena PA, Tur GT, Montero EM. Estudio de la composición ósea para su apropiada regeneración con materiales implantados. *Patología del Aparato Locomotor.* 2006; 4(3):202–7.
36. Bhagwat SA, Haytowitz DB, Holden JM. USDA database for the flavonoid content of selected foods, release 3. U.S. Department of Agriculture. 2011.
37. Bhargavan B, Gautam AK, Singh D, Kumar A, Chaurasia S, Tyagi AM, Yadav DK, Mishra JS, Singh AB, Sanyal S, Goel A, Maurya R, Chattopadhyay N. Methoxylated isoflavones, cajanin and isoformononetin, have non-estrogenic bone forming effect via differential mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling. *J Cell Biochem.* 2009 Oct 1;108(2):388-99.
38. Bhaskar SN. *Histología y Embriología bucal de Orban.* 11a ed. México: Mosby; 1993. p.22-24.
39. Bisson JF, Guardia-Llorens MA, Hidalgo S, Rozan P, Messaoudi M. Protective effect of Acticoa powder, a cocoa polyphenolic extract, on prostate carcinogenesis in Wistar-Unilever rats. *Eur. J. Can. Prev.* 2008; 17: 54-61.
40. Blanco J, Mareque S, Linares A, Muñoz F. Vertical and horizontal ridge alterations after tooth extraction in the dog: flap vs. flapless surgery. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22 (11): 1255-8.
41. Bondonno CP, Yang X, Croft KD, Considine MJ, Ward NC, Rich L, Puddey IB, Swinny E, Mubarak A, Hodgson JM. Flavonoid-rich apples and nitrate-rich spinach augment nitric oxide status and improve endothelial function in

- healthy men and women: a randomized controlled trial. *Free Radic Biol Med*. 2012 Jan 1;52(1):95-102.
42. Bostrom MPG, Seigerman DA. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. *HSS J*. 2005; 1 (1): 9-18.
43. Botolin S, Faugere MC, Malluche H, Orth M, Meyer R, McCabe LR. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice. *Endocrinology* 2005;146(8): 3622–31.
44. Boyan B, Ranly D, McMillan J, Sunwoo M, Roche K, Schwartz Z. Osteoinductive ability of human allograft formulations. *J Periodontol*. 2006 Sep; 77(9): p. 1555-63.
45. Browaeys H, Bouvry P, De Bruyn H. A literature review on biomaterials in sinus augmentation procedures. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2007 Sep; 9(3): p. 166-77.
46. Brugnami F, Then P, Moroi H, Kabani S, Leone C. GBR in human extraction sockets and ridge defects prior to implant placement: clinical results and histologic evidence of osteoblastic and osteoclastic activities in DFDBA. *Int J Per Rest Dent*. 1999 Jun; 19(3): p. 259-67.
47. Burgess TL, Quian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J cell biol* 1999;145: 527-38.
48. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt H, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration I. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1993; 13: p. 29-45.
49. Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, et al. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 2000; 87: 595–600.
50. Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, Maté-Sánchez JE, López-Marí L, Delgado-Ruiz R, Romanos GE. New bone formation in bone defects after melatonin and porcine bone grafts: experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Mar 6.
51. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Nedic M, Vasilic N, Wolinsky LE, et al. A controlled re-entry study on the effectiveness of bovine porous bone

- mineral used in combination with a collagen membrane of porcine origin in the treatment of intrabony defects in humans. *J Clin Periodontol.* 2000; 27 (12): 889–896.
52. Camelo M, Nevis ML, Schenk RK, Simlon M, Rasperini G, Lynch SE et al. Clinical, radiographic and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-oss y Bio-guide. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1998; 18(4): 321-31.
53. Cammack G, Nevins M, Clem D, Hatch J, Mellonig J. Histologic evaluation of mineralized and demineralized freeze-dried bone allograft for ridge and sinus augmentations. *Int J Per Rest Dent.* 2005 Jun; 25(3): p. 231-7.
54. Candel-Marti E, Peñarrocha-Oltra D, Bagán L, Peñarrocha-Diago MA, Peñarrocha-Diago M. Palatal positioned implants in severely atrophic maxillae versus conventional implants to support fixed full-arch prostheses: Controlled retrospective study with 5 years of follow-up. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015 Feb 7.
55. Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(9): 809-818.
56. Cardaropoli G, Araújo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced - augmented and non-augmented - defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005 May;32(5):435-40.
57. Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clin Oral Impl Res.* 2003; 14: 137–43.
58. Carnes DJ, De La Fontaine J, Cochran D, Mellonig J, Keogh B, Harris SGCN. Evaluation of 2 novel approaches for assessing the ability of demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol.* 1999 Apr; 70(4): p. 353-63.
59. Carnesecchi S, Schneider Y, Lazarus SA, et al. Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. *Cancer Lett* 2002;175:147-55.
60. Ceballos MA, Balmaseda MR, Pedroso CM, Alfonso SC. Banco de tejido óseo congelado para transplante. *Investigaciones Medicoquirúrgicas.* 2006; 2(8): 34-41.

61. Cheung S, Tai J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol Rep*. 2007;17:1525–31.
62. Chiapasco M, Zaniboni M, Rimondini L. Autogenous onlay bone grafts vs. alveolar distraction osteogenesis for the correction of vertically deficient edentulous ridges: a 2-4-year prospective study on humans. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Aug; 18: p. 432-40.
63. Choi EJ, Kim GH. Apigenin Induces Apoptosis through a Mitochondria/Caspase-Pathway in Human Breast Cancer MDA-MB-453 Cells. *J Clin Biochem Nutr*. 2009 May;44(3):260-5.
64. Choi EM. Apigenin increases osteoblastic differentiation and inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced production of interleukin-6 and nitric oxide in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Pharmazie*. 2007 Mar;62(3):216-20.
65. Cobb C, Eick J, Barker B, Mosby E. Restoration of mandibular continuity defects using combinations of hidroxiapatite and autogenous bone. Microscopic observations. *J Oral Maxillofac Surg*. 1990; 48: p. 268-75.
66. Committee on Research, Science and Therapy of the American Academy of Periodontology. Tissue banking of bone allografts used in periodontal regeneration *J Periodontol*. 2001 Jun;72(6):834-8.
67. Cornelini R, Cangini F, Martuscelli G, Wennström J. Deproteinized bovine bone and biodegradable barrier membranes to support healing following immediate placement of transmucosal implants: a short-term controlled clinical trial. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2004 Dec;24(6):555-63.
68. Coulthard P, Esposito M, Jokstad A, Worthington H. Interventions for replacing missing teeth: bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003; 3: p. CD003607.
69. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*. 2009 Aug;26(8):1001-43.
70. Cush JJ. Unusual toxicities with TNF inhibition: heart failure and drug-induced lupus. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:S141–7.
71. Cutando, A., Gómez-Moreno, G. and Arana, C. Superficies bioactivas en implantología: una nueva perspectiva. *Avances en Periodoncia* 2007, vol.19, suppl.1, p.43-50.

72. Cutando A, Arana C, Gómez-Moreno G, López A, Ferrera MJ, Reiter RJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Local application of melatonin into alveolar sockets of Beagle dogs reduces tooth renoval-induced oxidative stress. *J Periodontol* 2007, 78 (3): 576-83.
73. Deatherage J. Bone Materials Available for Alveolar Grafting. *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am.* 2010; 22: 347–52.
74. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Ramírez Fernández MP, Maté Sánchez del Val JE, Gómez Moreno G, Guardia J. Experimental models of bone response to bovine xenograft radiographic and histomorphometric. *Acta Odontol Colombiana.* 2011.
75. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2013 May 10;18(14):1818-92.
76. D' Este M, Eglin D, Alini M, Kyllönen L. Bone Regeneration with Biomaterials and Active Molecules Delivery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2015 Feb 5.
77. Devecioglu D, Tozum TF, Sengun D, Nohutcu RM. Biomaterials in periodontal regenerative surgery: effects of cryopreserved bone, commercially Available coral, demineralized freeze-dried dentin, and cementum on periodontal ligament fibroblast and osteoblast. *Journal of Biomaterials applications.* 2004(19): 107-120.
78. Dorman HJ, Koşar M, Başer KH, Hiltunen R. Phenolic profile and antioxidant evaluation of *Mentha x piperita* L. (peppermint) extracts. *Nat Prod Commun.* 2009; 4(4):535-42.
79. Dragland S, Senoo H, Wake K, Holte K, Blomhoff R. 2003. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J Nutr* 133: 128–190.
80. Ehlers S. Why does tumor necrosis factor targeted therapy reactivate tuberculosis? *J Rheumatol Suppl* 2005;74:35–9.
81. Esposito M, Grusovin M, Kwan S, Worthington H, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Jul; 16(3): p. CD003607.

82. Felzani R. Cicatrización de los tejidos con interés en cirugía bucal. *Acta Odontol Venez.* 2005; 43(3): 310-8
83. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006 Jan 1;11(1):E47-51.
84. Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, Bolz W, Huerzeler M. Hard tissue alterations after socket preservation: an experimental study in the beagle dog. *Clin Oral Impl Res.* 2008; 19 (11): 1111-18.
85. Finkelman R, Hardesty R, Rakijan. Increased IGF-II and TGF- β in calvarial bone: Graft survival implications. *J Dent Res.* 1992; 71: p. 116-20.
86. Finkemeier CG. Current concepts review bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone & Joint Surg.* 2002; 84(3): 454-464.
87. Froum S, Cho SC, Rosenberg E, Rohrer M, Tarnow D. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. *J Periodontol.* 2002 Jan;73(1):94-102.
88. Fuhrman B, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Grape powder polyphenols attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein E deficient (E0) mice and reduce macrophage atherogenicity. *J Nutr.* 2005 Apr;135(4):722-8.
89. Furukawa A, Oikawa S, Murata M, Hiraku Y, Kawanishi S. (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochem Pharmacol.* 2003 Nov 1;66(9):1769-78.
90. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1990 Mar;85(3):632-9.
91. Gerbi ME, Pinheiro AL, Marzola C, Limeira Júnior Fde A, Ramalho LM, Ponzi EA, et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(4): 382-8.
92. Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE et al. 1995. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol* 147: 278–292.

93. Gielkens P, Schortinghuis J, de Jong J, Paans A, Ruben J, Raghoobar G. The influence of barrier membranes on autologous bone grafts. *J Dent Res*. 2008 Nov; 87(11): p. 1048-52.
94. González-García R, Naval-Gías L, Muñoz-Guerra MF, Sastre-Pérez J, Rodríguez-Campo FJ, Gil-Díez-Usandizaga JL. Preprosthetic and implantological surgery in patients with severe maxillary atrophy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005 Aug-Oct;10(4):343-54.
95. Goto T, Hagiwara K, Shirai N, Yoshida K, Hagiwara H. Apigenin inhibits osteoblastogenesis and osteoclastogenesis and prevents bone loss in ovariectomized mice. *Cytotechnology*. 2014 Feb 6.
96. Guardia J, Gómez-Moreno G, Ferrera MJ, Cutando A. Evaluation of effects of topic melatonin on implant surface at 5 and 8 weeks in Beagle dogs. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2011 Dec;13(4):262-8.
97. Gupta D, Tuli S. Osteoinductivity of partially decalcified alloimplants in healing of large osteoperiosteal defects. *Acta Orthop Scand*. 1982 Dec; 53(6): p. 857-65.
98. Gupta S, Afaq F and Mukhtar H: Involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene* 21: 3727-3738, 2002.
99. Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 2001; 287(4): 914-920.
100. Guskuma MH, Hochuli-Vieira E, Pereira FP, Rangel-Garcia Junior I, Okamoto R, Okamoto T, Magro Filho O. Bone regeneration in surgically created defects filled with autogenous bone: an epifluorescence microscopy analysis in rats. *J Appl Oral Sci*. 2010 Jul-Aug;18(4):346-53.
101. Habibovic P, de Groot K. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007 Jan-Feb;1(1):25-32.
102. Haddad AJ, Peel SAF, Clokie CML, Sandor GKB. Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogenic and alloplastic bone substitutes. *The journal of craniofacial surgery*. 2006; 17(5): 926-934.

103. Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur J Pharmacol.* 2011 Jul 15;662(1-3):78-84.
104. Hakanson DO, Penny R, Bergstrom WH. Calcemic responses to photic and pharmacologic manipulation of serum melatonin. *Pediatr Res.* 1987 Oct;22(4):414-6.
105. Haldar C, Haussler D, Gupta D. Effect of the pineal gland on circadian rhythmicity of colony forming units for granulocytes and macrophages (CFU-GM) from rat bone marrow cell cultures. *J Pineal Res* 1992; 12:79–83.
106. Halleen JM, Räisänen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, Lehenkari PP, Kaija H, Vihko P, Väänänen HK. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem.* 1999 Aug 13;274(33):22907-10.
107. Hallund J, Bügel S, Tholstrup T, Ferrari M, Talbot D, Hall WL, Reimann M, Williams CM, Winberg N. Soya isoflavone-enriched cereal bars affect markers of endothelial function in postmenopausal women. *Br J Nutr.* 2006 Jun;95(6):1120-6.
108. Hämmerle C, Jung R, Yaman D, Lang N. Ridge augmentation by applying bioresorbable membranes and deproteinized bovine bone mineral: a report of twelve consecutive cases. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19(1): p. 19-25.
109. Hartman GA, Arnold RM, Mills MP, Cochran DL, Melloning JT. Clinical and histological evaluation of anorganic bovine bone collagen with or without a collagen barrier. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2004; 24: 3-11.
110. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002 Nov-Dec;96(2-3):67-202.
111. Heidari MR, Dadollahi Z, Mehrabani M, Mehrabi H, Pourzadeh-Hosseini M, Behravan E, Etemad L. Study of antiseizure effects of *Matricaria recutita* extract in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1171:300-4.
112. Hermann, F., Spieker, L., Ruschitzka, F., Sudano, I., Hermann, M., Binggeli, C., Luscher, T., Reisen, W., Noll, G., Corti, R. Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart* 2006; 92: 119-120.

113. Hernández Alemán Y, Riesgo Lovaina N, Rodríguez Méndez G, Alfonso Betancourt N. Uso de osteocoral como material de implante en bolsas infraóseas de dientes monorradiculares. Rev. Cubana Estomatol 1999;37(3):203-11.
114. Hirano T, Gotoh M, Oka, K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukaemic HL-60 cells. Life Sci. 1994, 55,1061-1069.
115. Hising P, Bolin A, Branting C. Reconstruction of severely resorbed alveolar ridge crests with dental implants using a bovine bone mineral for augmentation. Int J Oral Maxillofac Implants. 2001 Jan-Feb;16(1):90-7.
116. Hodgson JM. Effects of tea and tea flavonoids on endothelial function and blood pressure: a brief review. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006 Sep;33(9):838-41.
117. Horowitz R, Mazor Z, Miller R, Krauser J, Prasad H, Rohrer M. Clinical evaluation of alveolar ridge preservation with a β -tricalcium phosphate socket graft. Compend Contin Educ Dent. 2009; 30 (9):588-90.
118. Hubbard GP, Wolfram S, de Vos R, Bovy A, Gibbins JM, Lovegrove JA. Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: a pilot study. Br J Nutr. 2006 Sep;96(3):482-8.
119. Iasella JM, Greenwell H, Miller RL, Hill M, Drisko C, Bohra AA, et al. Ridge Preservation with Freeze-Dried Bone Allograft and a Collagen Membrane Compared to Extraction Alone for Implant Site Development: A Clinical and Histologic Study in Humans. J Periodontol. 2003; 74: 990-999.
120. Iliazarov G. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft tissue preservation. Clin Orthop. 1989; 238: p. 249-281.
121. Intini G, Andreana S, Intini FE, Buhite RJ, Bobek LA. Calcium sulfate and platelet-rich plasma make a novel osteoinductive biomaterial for bone regeneration. J Transl Med. 2007 Mar 7;5:13.
122. Irinakis T. Rationale for socket preservation after extraction of a single-rooted tooth when planning for future implant placement. J Can Dent Assoc 2006; 72(10): 917-22.

123. Ito K, Minegishi T, Takayama T, Tamura T, Yamada Y, Sato S. Effects of ipriflavone on augmented bone using a guided bone regeneration procedure. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Feb;18(1):60-8.
124. Jardine NJ. Phytochemicals and phenolics. En: *Chocolate and Cocoa Health and Nutrition.* Lan knight, 1999; 119-142.
125. Je HD, Kim HD, La HO. The Inhibitory Effect of Apigenin on the Agonist-Induced Regulation of Vascular Contractility via Calcium Desensitization-Related Pathways. *Biomol Ther (Seoul).* 2014 Feb;22(2):100-5.
126. Jeffrey O. Biology of bone healing: its impact on clinical therapy. In Lynch S. *Tissue Engineering: Applications in maxillofacial surgery and periodontics.* Illinois: Quintessence; 1999. p. 17-44.
127. Jeong YJ, Choi YJ, Kwon HM, Kang SW, Park HS, Lee M, Kang YH. Differential inhibition of oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells treated with different flavonoids. *Br J Nutr.* 2005 May;93(5):581-91.
128. Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, Bickford PC. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci.* 1999 Sep 15;19(18):8114-21.
129. Jourdain C, Tenca G, Deguercy A, Troplin P, Poelman D. In-vitro effects of polyphenols from cocoa and beta-sitosterol on the growth of human prostate cancer and normal cells. *Eur J Cancer Prev.* 2006;15(4):353-61.
130. Jung WW. Protective effect of apigenin against oxidative stress-induced damage in osteoblastic cells. *Int J Mol Med.* 2014 May;33(5):1327-34.
131. Kamiloglu S, Demirci M, Selen S, Toydemir G, Boyacioglu D, Capanoglu E. Home processing of tomatoes (*Solanum lycopersicum*): effects on in vitro bioaccessibility of total lycopene, phenolics, flavonoids, and antioxidant capacity. *J Sci Food Agric.* 2014 Aug;94(11):2225-33.
132. Kandaswami C, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton EJ. Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Lett.* 1991, 56, 147-152.
133. Kankilic B, Köse S, Korkusuz P. Mesenchymal Stem Cells And Nano-Bioceramics For Bone Regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2015 Feb 2.

134. Karim, M., McCormick, K., Kappagoda, C. Effects of cocoa procyanidins on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr* 2000; 130(S): 2105S-2108S.
135. Karring T, Lindhe J, Cortellini P. Tratamiento periodontal regenerativo. In Lindhe J. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. Madrid: Panamericana; 2000. p. 605-654.
136. Kasperk C, Ewers R, Simons B, Kasperk R. Hidroxiapatita derivada de algas (ficógena). Un estudio comparativo. *Av Period* 1990;2:103-110.
137. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*. 2002 May;8(3):147-59.
138. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci. Biotech. Biochem*. 1999, 63, 896-899.
139. Keating JF, McQueen MM. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J Bone Joint Surg*. 2001; 83-B(1):3-8.
140. Kelly KA, Tanaka S, Baron R, Gimble JM. Murine bone marrow stromally derived BMS2 adipocytes support differentiation and function of osteoclast-like cells in vitro. *Endocrinology* 1998;139:2092-101.
141. Kenny TP, Keen CL, Jones P, Kung HJ, Schmitz HH, Gershwin ME. Pentameric procyanidins isolated from *Theobroma cacao* seeds selectively downregulate ErbB2 in human aortic endothelial cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2004;229(3):255-63.
142. Khedgikar V, Gautam J, Kushwaha P, Kumar A, Nagar GK, Dixit P, Chillara R, Voruganti S, Singh SP, Uddin W, Jain GK, Singh D, Maurya R, Chattopadhyay N, Trivedi R. A standardized phytopreparation from an Indian medicinal plant (*Dalbergia sissoo*) has antiresorptive and bone-forming effects on a postmenopausal osteoporosis model of rat. *Menopause*. 2012 Dec;19(12):1336-46.
143. Kim HS, Suh KS, Ko A, Sul D, Choi D, Lee SK, Jung WW. The flavonoid glabridin attenuates 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative damage and cellular dysfunction in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Int J Mol Med*. 2013 Jan;31(1):243-51.
144. Klepp M, Hinrichs J, Eastlund T, Schaffer E. Histologic evaluation of demineralized freeze-dried bone allografts in barrier membrane covered

periodontal fenestration wounds and ectopic sites in dogs. *J Clin Periodontol.* 2004 Jul; 31(7): p. 534-44.

145. Kumar A, Samarth RM, Yasmeen S, Sharma A, Sugahara T, Terado T, et al. Anticancer and radioprotective potentials of *Mentha piperita*. *Biofactors* 2004;22:87-91.
146. Kuo ML, Yang NC. 1995. Reversion of V-H-Ras-transformed NIH 3T3 cells by apigenin through inhibiting mitogen-activated protein-kinase and its downstream oncogenes. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 767–775.
147. Kuo SM. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 1996, 110, 41-48.
148. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess TL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclasts differentiation and activation. *Cell* 1998;93: 165-76.
149. Lang N, Araújo M, Karring T. Formación de hueso alveolar. In Lindhe J. *Periodontología clínica e implantología odontológica.* 4th ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005. p. 907-939.
150. La VD, Tanabe S, Grenier D. Naringenin inhibits human osteoclastogenesis and osteoclastic bone resorption. *J Periodontal Res.* 2009 Apr;44(2):193-8.
151. La Vecchia C, Brinton LA, McTiernan A. Menopause, hormone replacement therapy and cancer. *Maturitas.* 2001 Aug 25;39(2):97-115.
152. Lang N, Araújo M, Karring T. Formación de hueso alveolar. In Lindhe J. *Periodontología clínica e implantología odontológica.* 4th ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005. p. 907-939.
153. Lang P, Becker W, Karring T. Formación de hueso alveolar. In Lindhe J. *Periodontología clínica e implantología odontológica.*: Panamericana; 2000. p. 916-948.
154. Laskin MD. *Cirugía Bucal Y maxilofacial.* Argentina: Panamericana; 1995. p.14-36.
155. Lee UL, Choi SW. *The Chemopreventive Properties and Therapeutic Modulation of Green Tea Polyphenols in Oral Squamous Cell Carcinoma.* ISRN Oncology 2011.

156. Lopley DM and Pelling JC: Induction of p21/WAF1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. *Mol Carcinog* 19: 74-82, 1997.
157. Lewandowska U, Szewczyk K, Hrabec E, Janecka A, Gorlach S. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. *J Agric Food Chem*. 2013 Dec 18;61(50):12183-99.
158. Li BB, Yu SF, Meng XM. The beneficial effect of genistein on mandible bone metabolism in ovariectomized rats. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2003 Sep;38(5):336-8.
159. Li S, Vert M. Hydrolytic degradation of the coral/poly(DL-lactic acid) bioresorbable material. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1996;7(9):817-27.
160. Liang S, Tang J, Shen YH, Jin HZ, Tian JM, Wu ZJ, Zhang WD, Yan SK. Biflavonoids from *Daphne feddei* and their inhibitory activities against nitric oxide production. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2008 Dec;56(12):1729-31.
161. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20: 1945 –1952.
162. Lin CC, Chuang YJ, Yu CC, Yang JS, Lu CC, Chiang JH, Lin JP, Tang NY, Huang AC, Chung JG. Apigenin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction in U-2 OS human osteosarcoma cells and inhibits osteosarcoma xenograft tumor growth in vivo. *J Agric Food Chem*. 2012 Nov 14;60(45):11395-402.
163. Lindenmeyer F, Li H, Menashi S, Soria C, Lu H. Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production. *Nutr Cancer*. 2001;39(1):139-47.
164. Liu LZ, Fang J, Zhou Q, Hu X, Shi X, Jiang BH. Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 635–43.
165. Liu X, Zhang DY, Zhang W, Zhao X, Yuan C, Ye F. The effect of green tea extract and EGCG on the signaling network in squamous cell carcinoma. *Nutr Cancer*. 2011;63(3):466-75.

166. Loke WM, Hodgson JM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Puddey IB, Croft KD. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am J Clin Nutr.* 2008 Oct;88(4):1018-25.
167. López J. Cirugía oral. España: Interamericana, McGraw-Hill; 1992.
168. Lozano-Carrascal N, Delgado-Ruiz RA, Gargallo-Albiol J, Maté-Sánchez JE, Hernandez Alfaro F, Calvo-Guirado JL. Xenografts Supplemented with Pamindronate placed in postextraction sockets to avoid crestal bone resorption. Experimental study in Fox hound dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2015 Jan 30.
169. Ludwig A, Lorenz M, Grimbo N, Steinle F, Meiners S, Bartsch C, Stangl K, Baumann G, Stangl V. The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Apr 9;316(3):659-65.
170. Lyons AB. 2000. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* 243:147–154.
171. Ma HP, Ming LG, Ge BF, Zhai YK, Song P, Xian CJ, Chen KM. Icaritin is more potent than genistein in promoting osteoblast differentiation and mineralization in vitro. *J Cell Biochem.* 2011 Mar;112(3):916-23.
172. Maestre-Ferrín L, Boronat-López A, Peñarrocha-Diago M, Peñarrocha-Diago M. Augmentation procedures for deficient edentulous ridges, using onlay autologous grafts: an update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009 Aug 1;14(8):e402-7.
173. Maggio M. Estrogen replacement therapy and endometrial cancer: the elusive link. *J Nurse Midwifery.* 1980 Mar-Apr;25(2):19-21.
174. Maiorana C, Beretta M, Grossi GB, Santoro F, Herford AS, Nagursky H, et al. Histomorphometric Evaluation of Anorganic Bovine Bone Coverage to Reduce Autogenous Grafts Resorption: Preliminary Results. *Open Dent J.* 2011; 5: 71-78.
175. Mak P, Leung YK, Tang WY, Harwood C, Ho SM. Apigenin suppresses cancer cell growth through ERbeta. *Neoplasia.* 2006 Nov;8(11):896-904.

176. Maki K, Nishida I, Kimura M. The effect of oral ipriflavone on the rat mandible during growth. *Eur J Orthod.* 2005 Feb;27(1):27-31.
177. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004 May;79(5):727-47.
178. Manjubala I, Sastry TP, Kumar RV. Bone in-growth induced by biphasic calcium phosphate ceramic in femoral defect of dogs. *J Biomater Appl.* 2005 Apr;19(4):341-60.
179. Mann C, Staba EJ. 1986. The chemistry, pharmacology, and commercial formulations of Chamomile. In *Herbs, Spices, and Medicinal Plants: Recent Advances in Botany, Horticulture, and Pharmacology Volume 1*, Craker LE, Simon JE (eds). Oryx Press: Phoenix, 235–280.
180. Mantena SK, Baliga MS, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2006 Aug;27(8):1682-91.
181. Manthey JA, Guthrie N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *J. Agr. Food Chem.* 2002, 50, 5837-5843.
182. Mao YW, Lin RD, Hung HC, Lee MH. Stimulation of osteogenic activity in human osteoblast cells by edible *Uraria crinita*. *J Agric Food Chem.* 2014 Jun 18;62(24):5581-8.
183. Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Impl Res.* 2010; 21 (7): 688-98.
184. Marinak K, Mellonig J, Towle H. The osteogenic potential of two human demineralized bone preparations using a xenogeneic model. *J Periodontol.* 1989 Jan; 60(1): p. 12-8.
185. Martínez C, Yañez J, Alcaraz M, Bernavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, Vicente V. Effects of several polyhydroxylated flavonoids on the growth of B16F10 melanoma and Melan-a cell lines. Influence of sequential oxidation state on the flavonoid skeleton. *Melanoma Res.* 2003, 13, 3-9.
186. Martínez-González JM, Barona Dorado C, Furió-Bacete V, Baca Pérez-Bryan R, Donado Azcárate A. La hidroxiapatita en el relleno de los defectos óseos. www.coem.org/revista/anterior/07_97/articulo.html

187. Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A, Cancedda R. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res*. 2005 Nov;8(4):277-84.
188. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, Quarto R. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(17):3230-7.
189. Mathur, S, Devaraj, S, Grundy, S, Jailal, I. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *J Nutr* 2002; 132: 3663-3667.
190. Mattout P. Pre and peri- implant guided bone regeneration. In Khoury F, Antoun H, Missika P. *Bone augmentation in oral implantology*. New Malden: Quintessence; 2007. p. 299-320.
191. McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res*. 2006 Jul;20(7):519-30.
192. Mehdikhani-Nahrkhalaji M, Fathi MH, Mortazavi V, Mousavi SB, Akhavan A, Haghghat A, Hashemi-Beni B, Razavi SM, Mashhadiabbas F. Biodegradable nanocomposite coatings accelerate bone healing: In vivo evaluation. *Dent Res J (Isfahan)*. 2015 Jan-Feb;12(1):89-99.
193. Mellonig J, Bowers G, Bailey R. Comparison of bone graft materials. Part I. New bone formation with autografts and allografts determined by Strontium-85. *J Periodontol*. 1981; 52: p. 291-296.
194. Mellonig J, Bowers G, Cotton W. Comparison of bone graft materials. Part II. New bone formation with autografts and allografts: a histological evaluation. *J Periodontol*. 1981 Jun; 52(6): p. 297-302.
195. Mellonig JT. Autogenous and Allogeneic Bone Grafts in Periodontal Therapy. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1992; 3(4):333–52.
196. Merli M, Migani M, Esposito M. Vertical ridge augmentation with autogenous bone grafts: resorbable barriers supported by osteosynthesis plates versus titanium-reinforced barriers. A preliminary report of a blinded, randomized controlled clinical trial. *Int Oral Maxillofac Implants*. 2007; 22: p. 373-82.

197. Mian KH, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem.* 2001 Jun;49(6):3106-12.
198. Miller EG, Peacock JJ, Bourland TC, Taylor SE, Wright JM, Patil BS, et al. Inhibition of oral carcinogenesis by citrus flavonoids. *Nutr Cancer* 2008; 60: 69-74.
199. Minato K, Miyake Y, Fukumoto S, Yamamoto K, Kato Y, Shimomura Y, Osawa T. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver *Life Sci.* 2003;72(14):1609-16.
200. Minegishi T, Kawamoto K, Yamada Y, Oshikawa M, Kishida M, Sato S, Ito K. Effects of ipriflavone on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvaria. *J Oral Sci.* 2002 Mar;44(1):7-11.
201. Ming LG, Chen KM, Xian CJ. Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling. *J Cell Physiol.* 2013 Mar;228(3):513-21.
202. Misch C, Silc J. Socket Grafting and Alveolar Ridge Preservation. *Dentistry today.* 2008. <http://www.dentistrytoday.com/implants/1256>
203. Miyake Y, Yamamoto K, Osawa T. Metabolism of antioxidant in lemon fruit (*Citrus limon* BURM. f.) by human intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem* 1997; 45:3738–3742.
204. Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N, Osawa T. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids* 1998; 33: 689–695.
205. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg.* 2001 Jun;71(6):354-61.
206. Mothana RA, Kriegisch S, Harms M, Wende K, Lindequist U. Assessment of selected Yemeni medicinal plants for their in vitro antimicrobial, anticancer, and antioxidant activities. *Pharm Biol.* 2011 Feb;49(2):200-10.
207. Mulinacci N, Romani A, Pinelli P, Vincieri FF, Prucher D. 2000. Characterization of *Matricaria recutita* L. flower extracts by HPLC-MS and HPLC-DAD analysis. *Chromatographia* 51: 301–307.

208. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodelling. *J Bone Miner Res* 1993;8: 505-10.
209. Muñoz F, López-Peña M, Miño N, Gómez-Moreno G, Guardia J, Cutando A. Topical application of melatonin and growth hormone accelerates bone healing around dental implants in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012 Apr;14(2):226-35.
210. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Jan;66(2):236-53.
211. Nakamura H, Ukai T, Yoshimura A, Kozuka Y, Yoshioka H, Yoshinaga Y, Abe Y, Hara Y. Green tea catechin inhibits lipopolysaccharide-induced bone resorption in vivo. *J Periodontal Res*. 2010 Feb;45(1):23-30.
212. Nakamura M, Nakamichi Y, Nakamura H, Udagawa N. Osteoclastogenesis and bone resorption. *Nihon Rinsho*. 2009 May;67(5):889-96.
213. Nakamura M, Uehara S, Nakamura H, Udagawa N. Cytokine-mediated bone resorption. *Clin Calcium*. 2014 Jun;24(6):837-44.
214. Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, Basu De & D. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res*. 2010; 132: 15-30.
215. Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. *Periodontol* 2000. 1999 Feb;19:74-86.
216. Norton MR, Odell EW, Thompson ID, Cook RJ. Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Dec;14(6):775-83.
217. Offord EA, Macé K, Ruffieux C, Malnoë A, Pfeifer AM. Rosemary components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis*. 1995; 16(9): 2057-62.
218. Ogata S, Miyake Y, Yamamoto K, Okumura K, Taguchi H. Apoptosis induced by the flavonoid from lemon fruit (*Citrus limon* BURM. f.) and its metabolites in HL-60 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2000; 64: 1075-1078.

219. Ohno M, Sakamoto KQ, Ishizuka M, Fujita S. Crude cacao Theobroma cacao extract reduces mutagenicity induced by benzo[a]pyrene through inhibition of CYP1A activity in vitro. *Phytother Res.* 2009;23(8):1134-9.
220. Opara EI, Chohan M. Culinary herbs and spices: their bioactive properties, the contribution of polyphenols and the challenges in deducing their true health benefits. *Int J Mol Sci.* 2014 Oct 22;15(10):19183-202.
221. Oporto-Venegas G, Fuentes-Fernández R, Álvarez-Cantoni H, Borie-Echeverría E. Maxillomandibular morphology and physiology recovery: Biomaterials in bone regeneration. *Int J Morphol* 2008;26(4): 853-859.
222. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Terao J, Kondo K: Catechins and their oligomers linked by C4 --> C8 bonds are major cacao polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227(1): 51-56.
223. Osakabe N, Takano H, Sanbongi C, Yasuda A, Yanagisawa R, Inoue K, Yoshikawa T. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. *Biofactors.* 2004; 21: 127–31.
224. Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Nowak M, Swietochowska E, Marek B, Gorski J, Kajdaniuk D, Wolkowska K. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. *Endocr Regul.* 2003 Dec;37(4):211-24.
225. Pandey M, Kaur P, Shukla S, Abbas A, Fu P, Gupta S. Plant flavone apigenin inhibits HDAC and remodels chromatin to induce growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells: in vitro and in vivo study. *Mol Carcinog.* 2012 Dec;51(12):952-62.
226. Paolantonio M. Combined periodontal regenerative technique in human intrabony defects by collagen membranes and anorganic bovine bone. A controlled clinical study. *J Periodontol.* 2002; 73: 158-166.
227. Papadaki HA, Tsatsanis C, Christoforidou A, Malliaraki N, Psyllaki M, Pontikoglou C, Miliaki M, Margioris AN, Eliopoulos GD. Alendronate reduces serum TNFalpha and IL-1beta, increases neutrophil counts, and improves bone mineral density and bone metabolism indices in patients with chronic idiopathic neutropenia (CIN)-associated osteopenia/osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(6):577-87.

228. Park JA, Ha SK, Kang TH, Oh MS, Cho MH, Lee SY, Park JH, Kim SY. Protective effect of apigenin on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Life Sci.* 2008 Jun 20;82(25-26):1217-23.
229. Park JB, Lee JY, Park YJ, Rhee SH, Lee SC, Kim TI. Enhanced bone regeneration in Beagle dog with bovine bone mineral coated with a sintetic oligopeptide. *J Periodontol.* 2007; 78: 2150-2155.
230. Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol.* 2007;30(1):233-45.
231. Paul B, Horning G, Hellstein J, Schafer D. The osteoinductive potential of demineralized freeze-dried bone allograft in human non-orthotopic sites: a pilot study. *J Periodontol.* 2001 Aug; 72(8): p. 1064-8.
232. Peng S, Zhang G, He Y, Wang X, Leung P, Leung K, Qin L. Epimedium-derived flavonoids promote osteoblastogenesis and suppress adipogenesis in bone marrow stromal cells while exerting an anabolic effect on osteoporotic bone. *Bone.* 2009 Sep;45(3):534-44.
233. Pérez RA, Won JE, Knowles JC, Kim HW. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Apr;65(4):471-96.
234. Pérez-Sánchez MJ, Ramírez-Glindon E, Lledó-Gil M, Calvo-Guirado JL, Pérez-Sánchez C. Biomaterials for bone regeneration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 May 1;15(3):e517-22.
235. Petersen M, Simmonds MS. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 2003;62:121–5.
236. Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev* 2002;23:90–119.
237. Piattelli A, Scarano A, Corigliano M, Piattelli M. Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. *Biomaterials.* 1996 Jun; 17(11): p.1127-31.
238. Piantelli M, Rinelli A, Macri E, Maggiano N, Larocca LM, Scerrati A, Roselli R, Iacoangeli M, Scambia G, Capella A, Ranelletti FO. Type II estrogen binding sites and antiproliferative activity of quercetin in human meningiomas. *Cancer* 1993, 63, 193-198.

239. Pierre S, Crosbie L, Duttaroy AK. 2005. Inhibitory effect of aqueous extracts of some herbs on human platelet aggregation in vitro. *Platelets* 16: 469–473.
240. Pilipchuk SP, Plonka AB, Monje A, Taut AD, Lanis A, Kang B, Giannobile WV. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dent Mater.* 2015 Feb 17. pii: S0109-5641(15)00020-2.
241. Piña-Barba MC, Acevedo NM, Palma Cortés R, Lima E. Caracterización de hueso de bovino anorgánico: Nukbone. *Acta Ortop Mex.* 2006; 20 (4): 150-155.
242. Ramírez-Fernández MP, Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Maté-Sánchez del Val JE, Gómez-Moreno G, Guardia J. Experimental model of bone response to xenografts of bovine origin (Endobon): a radiological and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Jul;22(7):727-34.
243. Ramljak, D.; Romanczyk, L.J.; Metheny-Barlow, L.J.; Thompson, N.; Knezevic, V.; Galperin, M.; Ramesh, A.; Dickson, R.B. Pentameric procyanidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2005;4:537-546.
244. Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res* 2008; 52: 507–526.
245. Rawat P, Kumar M, Sharan K, Chattopadhyay N, Maurya R. Ulmosides A and B: flavonoid 6-C-glycosides from *Ulmus wallichiana*, stimulating osteoblast differentiation assessed by alkaline phosphatase. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009 Aug 15;19(16):4684-7.
246. Regezi J, Sciubba J. Patología bucal, correcciones clinicopatológicas. 3a ed. Mexico: McGraw Hill interamericana; 2000.
247. Rein D, Lolito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* 2000; 130: 2109-14.
248. Rein, D., Paglieroni, T., Wun, T. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr* 2000; 72, 30-35.
249. Rescigno M, Martino M, Sutherland CL, Gold MR, and Ricciardi-Castagnoli P. 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 188:2175–2180.

250. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL. Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *Dent Clin North Am.* 2010; 54:55–71.
251. Riancho JA, Gutiérrez GE. Factores reguladores de la reabsorción ósea. *Rev Metab Oseo Min* 2003; 1(2):51-66.
252. Rocha FS, Ramos LM, Batista JD, Zanetta-Barbosa D, Ferro EA, Dechichi P. Bovine anorganic bone graft associated with platelet-rich plasma: histologic analysis in rabbit calvaria. *J Oral Implantol.* 2011 Oct;37(5):511-8.
253. Rodriguez J, Yañez J, Vicente V, Alcaraz M, Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, Lozano JA. Effects of several flavonoids on the growth of B16F10 and SK-MEL-1 melanoma cell lines: relationship between structure and activity. *Melanoma Res.* 2002, 12, 99-107.
254. Rodríguez JP, Astudillo P, Ríos S, Seitz G, Pino AM. Adipogenesis and osteoporosis. *Rev Med Chil.* 2009 Jun;137(6):827-36.
255. Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13960–5.
256. Roos y Rosmer. *Histología.* Argentina: Medico Panamericana; 1998. p. 21-24.
257. Roriz V, Rosa A, Peitl O, Zanotto E, Panzeri H, de Oliveira P. Efficacy of a bioactive glass–ceramic (Biosilicates) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. *Clin Oral Impl Res.* 2009; 21: 148–55.
258. Ross JA y Kasum CM: Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr,* 2002, 22:19-34.
259. Sahu A, Rawal N, Pangburn MK. Inhibition of complement by covalent attachment of rosmarinic acid to activated C3b. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57: 1439–46.
260. Samman MA, Bowen ID, Taiba K, Antonius J, Hannan MA. Mint prevents shamma-induced carcinogenesis in hamster cheek pouch. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1795-801.

261. Sancheti G, Goyal PK. Effect of *Rosmarinus officinalis* in modulating 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced skin tumorigenesis in mice. *Phytotherapy Research*; 2006; 20(11): 981-986.
262. Sánchez MA, Berini L, Gay-Escoda C. Los diferentes tipos de hidroxiapatita y sus aplicaciones en cirugía bucal. *Av Odontoestomatol* 1993;9:633-8.
263. Schliephake H. Application of bone growth factors--the potential of different carrier systems. *Oral Maxillofac Surg*. 2010 Mar;14(1):17-22.
264. Schwartz Z, Mellonig J, Carnes DJ, de la Fontaine J, Cochran D, Dean D. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol*. 1996 Sep; 67(9): p. 918-26.
265. Schwartz Z, Somers A, Mellonig J, Carnes DJ, Dean D, Cochran D, et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. *J Periodontol*. 1998 Apr; 69(4): p. 470-8.
266. Shafer WG, Levy BM. *Tratado de patología bucal*. 2a ed. México: Interamericana; 1986.
267. Sharan K, Siddiqui JA, Swarnkar G, Maurya R, Chattopadhyay N. Role of phytochemicals in the prevention of menopausal bone loss: evidence from in vitro and in vivo, human interventional and pharma-cokinetic studies. *Curr Med Chem*. 2009;16(9):1138-57.
268. Sharan K, Siddiqui JA, Swarnkar G, Tyagi AM, Kumar A, Rawat P, Kumar M, Nagar GK, Arya KR, Manickavasagam L, Jain GK, Maurya R, Chattopadhyay N. Extract and fraction from *Ulmus wallichiana* Planchon promote peak bone achievement and have a nonestrogenic osteoprotective effect. *Menopause*. 2010 Mar;17(2):393-402.
269. Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P, Simmen BR, Gay RE, Gay S. Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000 Nov;43(11):2523-30.
270. Shors EC. Coralline bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*. 1999 Oct;30(4):599-613.
271. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone Healing and Soft Tissue Contour Changes Following Single-Tooth Extraction: A Clinical and

- Radiographic 12-Month Prospective Study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2003; 23(4): 313-23.
272. Shukla S, Gupta S. Molecular targets for apigenin-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell xenograft. *Mol Cancer Ther* 2006;5(4):843-52.
273. Shukla S, Gupta S. Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(10):1833-45.
274. Shukla S, Gupta S. Apigenin and Cancer Chemoprevention. En *Biactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables*. New York: Academic Press; 2010. Vol. 41, pp 665.
275. Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res.* 2010 Jun;27(6):962-78.
276. Siddiqui JA, Swarnkar G, Sharan K, Chakravarti B, Sharma G, Rawat P, Kumar M, Khan FM, Pierroz D, Maurya R, Chattopadhyay N. 8,8''-Biapigeninyl stimulates osteoblast functions and inhibits osteoclast and adipocyte functions: Osteoprotective action of 8,8''-biapigeninyl in ovariectomized mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Jul 29;323(2):256-67.
277. Simion M, Fontana F, Rasperini G, Maiorana C. Vertical ridge augmentation by expanded-polytetrafluoroethylene membrane and a combination of intraoral autogenous bone graft and deproteinized anorganic bovine bone (Bio Oss). *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18: p. 620-29.
278. Simko F, Paulis L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. *J Pineal Res.* 2007 Apr;42(4):319-22.
279. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luethy R et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89: 309-19.
280. Simunek A, Kopecka D, Somanathan R, Pilathadka S, Brazda T. Deproteinized bovine bone versus beta-tricalcium phosphate in sinus augmentation surgery: a comparative histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008 Sep-Oct; 23(5).
281. Singletary KW, Nelshoppen JM. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary tumorigenesis and

of in vivo formation of mammary DMBA-DNA adducts by rosemary extract. *Cancer Lett.* 1991; 60(2): 169-75.

282. Smiler D, Jonson P, Lozada J. Injertos para elevación sinusal e implantes endoóseos. *Clin Odontol North Am.* 1992; 1: p. 155-92.
283. Soares Rocha F, Alencar Ramos LM, Dantas Batista J, Zanetta-Barbosa D, Dechichi P. Organic bovine graft associated with PRP in rabbit calvaria. *Arq Int Otorrinolaringol.* 2011; 15 (2): 208-213.
284. Soliman KM, Badeaa RI. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol* 40: 1669 –1675.
285. Solís MK, Nart MJ, Violant HD, Santos AA. Tratamiento del alveolo post-extracción. Revisión de la literatura actual. *Rev Eso Odontoestomatol implant.* 2009; 17(1) 7-17.
286. Songlin P, Ge Z, Yixin H, Xinluan W, Pingchung L, Kwoksui L, Ling Q. Epimedium-derived flavonoids promote osteoblastogenesis and suppress adipogenesis in bone marrow stromal cells while exerting an anabolic effect on osteoporotic bone. *Bone* 2009 Sep;45(3):534-44.
287. Spoerlein C, Mahal K, Schmidt H, Schobert R. Effects of chrysin, apigenin, genistein and their homoleptic copper(II) complexes on the growth and metastatic potential of cancer cells. *J Inorg Biochem.* 2013 Oct;127:107-15.
288. Starzl TE, Zinkernagel RM. 1998. Antigen localization and migration in immunity and tolerance. *N Engl J Med* 339:1905–1913.
289. Steinberg FM, Holt RR, Schmitz HH and Keen CL. Cocoa procyanidin chain length does not determine ability to protect LDL from oxidation when monomer units are controlled. *J Nutr Bioch* 2002;13:645-652.
290. Suh KS, Oh S, Woo JT, Kim SW, Kim JW, Kim YS, Chon S. Apigenin attenuates 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative cell damage in HIT-T15 pancreatic β -cells. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(1):121-6.
291. Sukmanskii OI. Isoflavones and calcified tissues. *Usp Fiziol Nauk.* 2002 Apr-Jun;33(2):83-94.

292. Swarnkar G, Sharan K, Siddiqui JA, Chakravarti B, Rawat P, Kumar M, Arya KR, Maurya R, Chattopadhyay N. A novel flavonoid isolated from the steam-bark of *Ulmus wallichiana* planchon stimulates osteoblast function and inhibits osteoclast and adipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol*. 2011 May 11;658(2-3):65-73.
293. Takagi K, Kudo A. Bone marrow stromal cell lines having high potential for osteoclast-supporting activity express PPARgamma1 and show high potential for differentiation into adipocytes. *J Bone Miner Metab*. 2008;26(1):13-23.
294. Takahashi T, Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T. Structure-activity relationships of flavonoids and the induction of granulocytic- or monocytic-differentiation in HL60 human myeloid leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998; 62: 2199–2204.
295. Tapety F, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Impl Res*. 2004; 15: 315–24.
296. Taylor LP, Grotewold E. Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol*. 2005 Jun;8(3):317-23.
297. Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol* 1987;138:775–9.
298. Thomson AW, Lu L, Murase N, Demetris AJ, Rao AS, and Starzl TE. 1995. Microchimerism, dendritic cells progenitors and transplantation tolerance. *Stem Cells* 13:622–639.
299. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, 46, 1733—1742 (1997).
300. Tonelli P, Duvina M, Barbato L, Biondi E, Nuti N, Brancato L, Rose GD. Bone regeneration in dentistry. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2011 Sep;8(3):24-8.
301. Trejo AMR, Calleja AI, Nicolaievsky SE. Cicatrización alveolar post extracción y sus potenciales complicaciones. *J Am Dent Assoc*. 2005; 62(3): 91-93.

302. Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem* 2007; 104: 466-479.
303. Trombelli L, Farina R, Marzola A, Bozzi L, Liljenberg B, Lindhe J. Modelling and remodelling of human extraction sockets. *J Clin Periodontol*. 2008. 35: 630-9.
304. Tudor C, Srour S, Thorwarth M, Stockmann P, Neukam FW, Nkenke E, Schlegel KA, Felszeghy E. Bone regeneration in osseous defects-application of particulated human and bovine materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Apr;105(4):430-6.
305. Tuli S, Singh A. The osteoinductive property of decalcified bone matrix. An experimental study. *J Bone Joint Surg Br*. 1978 Feb; 60(1): p. 116-23.
306. Urist M. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965 Nov; 150(698): p. 893-9.
307. Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralized freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss): a clinical study of 20 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997 Jun;17(3):232-41.
308. Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 1048–58.
309. Van Steenberghe D, Callens A, Geers L, Jacobs R. The clinical use of deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration in conjunction with immediate implant installation. *Clin Oral Implants Res*. 2000 Jun;11(3):210-6.
310. Vargas L. Preservación de alveolos post exodoncia mediante el uso de diferentes materiales de injerto. Tesis para optar el título de periodoncista. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2011.
311. Veitch NC, Grayer RJ. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Nat Prod Rep*. 2008 Jun;25(3):555-611.
312. Vicario EC. El efecto osteoinductor de la matriz de los aloinjertos: Estudio experimental en cultivos de osteoblastos humanos. [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2003.

313. Wan Y, Vinson J, Etherton T, Proch J, Lazarus S, Kris-Etherton P. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *J Am Clin Nutr* 2001; 74: 596-602.
314. Wang B, Jenkins JR, Trayhurn P. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF-alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288(4):E731-40.
315. Wang L, Lee IM, Zhang SM, Blumberg JB, Buring JE, Sesso HD. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *Am J Clin Nutr.* 2009 Mar;89(3):905-12.
316. Wang W, Heideman L, Chung CS, Pelling JC, Koehler KJ, Birt DF. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol Carcinog.* 2000 Jun;28(2):102-10.
317. Wei H, Tye L, Bresnick E, Birt DF. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Res* 1990; 50: 499-502.
318. Weitzmann MN, Pacifici R. The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev* 2005;208:154-68.
319. Willett W C. Dieta, nutrición y prevención del cáncer. En: *Nutrición en salud y enfermedad.* 9ª ed. Mc Graw Hill, México, 2002; 2:1441-1452.
320. Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and qualification. *Food Res.* 2000; 33:423-477.
321. Yamamoto, H., Sakakibara, J., Nagatsu, A. and Sekiya, K. Inhibitors of arachidonate lipoxygenase from defatted perilla seed. *J. Agric. Food Chem* 1998; 46: 862-865.
322. Yang SF, Yang WE, Kuo WH, Chang HR, Chu SC, Hsieh YS. Antimetastatic potentials of flavones on oral cancer cell via an inhibition of matrix-degrading proteases. *Arch Oral Biol.* 2008 Mar;53(3):287-94.
323. Yildirim M, Spiekermann H, Handt S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for

- qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001 Jan-Feb;16(1):23-33.
324. Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 1999; 9: 369–376.
325. Yin F, Giuliano AE, Law RE, Van Herle AJ. Apigenin inhibits growth and induces G2-M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. *Anticancer Res* 2001; 21: 413–20.
326. Yong MA, Zeng M, Sun R, Hu M. Disposition of Flavonoids Impacts their Efficacy and Safety. *Curr Drug Metab*. 2015 Feb 6.
327. Yoon MS, Lee JS, Choi BM, Jeong YI, Lee CM, Park JH, Moon Y, Sung SC, Lee SK, Chang YH, Chung HY, Park YM. Apigenin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: Implication of immunotherapeutic adjuvant. *Mol Pharmacol*. 2006 Sep;70(3):1033-44.
328. Yukna R, Vastardis S. Comparative evaluation of decalcified and non-decalcified freeze-dried bone allografts in rhesus monkeys. I. Histologic findings. *J Periodontol*. 2005 Jan; 76(1): p. 57-65.
329. Zern TL, Wood RJ, Greene C, West KL, Liu Y, Aggarwal D, Shachter NS, Fernandez ML. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J Nutr*. 2005 Aug;135(8):1911-7.
330. Zhang X, Wang G, Gurley EC, Zhou H. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. *PLoS One*. 2014 Sep 5;9(9):e107072.
331. Zheng P.W. et al. Apigenin induced apoptosis through p53- dependent pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sci* 2005; 76: 1367–1379).
332. Zhu JF, Valente AJ, Lorenzo JA, Carnes D, Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human osteoblastic cells stimulated by proinflammatory mediators. *J Bone Miner Res* 1994;9:1123–30.
333. Zihelli J. Principios Generales de la cicatrización pertinente al problema periodontal. México: Interamericana; 1991. p.16-18.

334. Zitzmann N, Schärer P, Marinello C, Schüpbach P, Berglundh T. Alveolar Ridge Augmentation with Bio-Oss: A Histologic Study in Humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001; 21: 289–95.
335. Zoricic S, Bobinac D, Lah B, Maric I, Cvijanovic O, Bajek S, Golubovic V, Mihelic R. Study of the healing process after transplantation of pasteurized bone grafts in rabbits. *Acta Med Okayama.* 2002 Jun;56(3):121-8.
336. Zubillaga G, Von Hagen S, Simon B, Deasy M. Changes in alveolar bone height and width following post-extraction ridge augmentation using a fixed bioabsorbable membrane and demineralized freeze-dried bone osteoconductive graft. *J Periodontol.* 2003; 74: 965-75.

9. ANEXOS

Ficha técnica del Flavonoide

(5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*)

Ficha técnica de otro osteoinductor

(N-Acetyl-5-methoxytryptamine, *Sigma-Aldrich Química, S.L.*)

SIGMA-ALDRICH *sigma-aldrich.com*

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

de acuerdo el Reglamento (CE) No. 1907/2006 Versión 5.0 Fecha de revisión 07.01.2013 Fecha de impresión 25.09.2014

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O LA MEZCLA Y DE LA SOCIEDAD O LA EMPRESA

1.1 Identificadores del producto

Nombre del producto: **Apigenin**

Referencia: 01760595

Marca: Fluka

No. CAS: 520-36-5

1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados

Usos identificados: Reactivos para laboratorio, Fabricación de sustancias

1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad

Compañía: Sigma-Aldrich Quimica, S.L.

Ronda de Poniente, 3

Aptdo. Correos 278

E-28760 TRES CANTOS -MADRID

Teléfono: +34 91 6619977

Fax: +34 91 6619642

E-mail de contacto: eurtechserv@sial.com

1.4 Teléfono de emergencia

Teléfono de Urgencia: 704100087

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla

Clasificación de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008 [UE-GHS/CLP]

Irritación cutánea (Categoría 2)

Irritación ocular (Categoría 2)

Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única (Categoría 3)

Clasificación de acuerdo con las Directivas de la UE 67/548/CEE ó 1999/45/CE

Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias.

2.2 Elementos de la etiqueta

Etiquetado de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008 [UE-GHS/CLP]

Pictograma

Palabra de advertencia Atención

Indicación(es) de peligro

H315 Provoca irritación cutánea.

H319 Provoca irritación ocular grave.

H335 Puede irritar las vías respiratorias.

Declaración(es) de prudencia

P261 Evitar respirar el polvo.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

Declaración Suplementaria del ninguno(a)

Peligro

De acuerdo con la Directiva Europea 67/548/CEE, y sus enmiendas.

Símbolo(s) de peligrosidad

Frase(s) - R

R36/37/38 Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias.

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

Frase(s) - S

S26 En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

2.3 Otros Peligros - ninguno(a)

3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

3.1 Sustancias

Peso molecular: 270,24 g/mol

Componente Concentración

5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-benzopyrone

No. CAS

No. CE

520-36-5

208-292-3

-

4. PRIMEROS AUXILIOS

4.1 Descripción de los primeros auxilios

Recomendaciones generales

Consultar a un médico. Mostrar esta ficha de seguridad al doctor que esté de servicio.

Si es inhalado

Si aspiró, mueva la persona al aire fresco. Si ha parado de respirar, hacer la respiración artificial.

Consultar a un médico.

En caso de contacto con la piel

Eliminar lavando con jabón y mucha agua. Consultar a un médico.

En caso de contacto con los ojos

Lávese a fondo con agua abundante durante 15 minutos por lo menos y consulte al médico.

Si es tragado

Nunca debe administrarse nada por la boca a una persona inconsciente. Enjuague la boca con agua. Consultar a un médico.

4.2 Principales síntomas y efectos, agudos y retardados

Según nuestras informaciones, creemos que no se han investigado adecuadamente las propiedades químicas, físicas y toxicológicas.

4.3 Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente sin datos disponibles

5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS

5.1 Medios de extinción

Medios de extinción apropiados

Usar agua pulverizada, espuma resistente al alcohol, polvo seco o dióxido de carbono.

5.2 Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla

Óxidos de carbono

5.3 Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios

Si es necesario, usar equipo de respiración autónomo para la lucha contra el fuego.

5.4 Otros datos sin datos disponibles

6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

6.1 Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

Utilícese equipo de protección individual. Evite la formación de polvo. Evitar respirar los vapores, la neblina o el gas. Asegúrese una ventilación apropiada. Evacuar el personal a zonas seguras. Evitar respirar el polvo.

6.2 Precauciones relativas al medio ambiente

No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado.

6.3 Métodos y material de contención y de limpieza

Recoger y preparar la eliminación sin originar polvo. Limpiar y traspalar. Guardar en contenedores apropiados y cerrados para su eliminación.

6.4 Referencia a otras secciones

Para eliminación de desechos ver sección 13.

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

7.1 Precauciones para una manipulación segura

Evítese el contacto con los ojos y la piel. Evítese la formación de polvo y aerosoles. Debe disponer de extracción adecuada en aquellos lugares en los que se forma polvo.

7.2 Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades

Almacenar en un lugar fresco. Conservar el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y bien ventilado.

7.3 Usos específicos finales sin datos disponibles

8. CONTROLES DE EXPOSICIÓN/ PROTECCIÓN INDIVIDUAL

8.1 Parámetros de control

Componentes con valores límite ambientales de exposición profesional.

No contiene sustancias con valores límites de exposición profesional.

8.2 Controles de la exposición

Controles técnicos apropiados

Manipular con las precauciones de higiene industrial adecuadas, y respetar las prácticas de seguridad. Lávense las manos antes de los descansos y después de terminar la jornada laboral.

Protección personal

Protección de los ojos/ la cara

Gafas de seguridad con protecciones laterales conformes con la EN166 Use equipo de protección para los ojos probado y aprobado según las normas gubernamentales correspondientes, tales como NIOSH (EE.UU.) o EN 166 (UE).

Protección de la piel

Manipular con guantes. Los guantes deben ser inspeccionados antes de su uso. Utilice la técnica correcta de quitarse los guantes (sin tocar la superficie exterior del guante) para evitar el contacto de la piel con este producto. Deseche los guantes contaminados después de su uso, de conformidad con las leyes aplicables y buenas prácticas de laboratorio. Lavar y secar las manos. Los guantes de protección seleccionados deben de cumplir con las especificaciones de la Directiva de la UE 89/686/CEE y de la norma EN 374 derivado de ello.

Sumerción

Material: Caucho nitrilo espesura mínima de capa: 0,11 mm

Tiempo de perforación: 480 min

Material probado: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Talla M)

Protección contra salpicaduras

Material: Caucho nitrilo espesura mínima de capa: 0,11 mm

Tiempo de perforación: 480 min

Material probado: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Talla M)

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

origen de datos: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, Teléfono +49 (0)6659 87300, e-mail sales@kcl.de, Método de prueba: EN374

Si es utilizado en solución, o mezclado con otras sustancias, y bajo condiciones diferentes de la EN 374, ponerse en contacto con el proveedor de los guantes aprobados CE. Esta recomendación tiene carácter meramente consultivo y debe ser evaluado por un Higienista Industrial familiarizado con la situación específica de uso previsto por nuestros clientes. No debe interpretarse como una aprobación de oferta para cualquier escenario de uso específico.

Protección Corporal

indumentaria impermeable, El tipo de equipamiento de protección debe ser elegido según la concentración y la cantidad de sustancia peligrosa al lugar específico de trabajo.

Protección respiratoria

Para exposiciones molestas use respirador de partículas tipo P95 (EE.UU.) o tipo P1 (UE EN 143). Para un nivel de protección mayor use cartuchos de respirador tipo OV/AG/P99 (EE.UU.) o ABEK-P2 (UE EN 143). Usar respiradores y componentes testados y aprobados bajo los standards gubernamentales apropiados como NIOSH (EEUU) o CEN (UE)

9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

9.1 Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

- a) Aspecto Forma: polvo
- Color: amarillo claro
- b) Olor sin datos disponibles
- c) Umbral olfativo sin datos disponibles
- d) pH sin datos disponibles
- e) Punto de fusión/ punto de congelación
Punto/intervalo de fusión: 300 °C
- f) Punto inicial de ebullición e intervalo de ebullición sin datos disponibles
- g) Punto de inflamación sin datos disponibles
- h) Tasa de evaporación sin datos disponibles
- i) Inflamabilidad (sólido, gas) sin datos disponibles
- j) Inflamabilidad superior/inferior o límites explosivos sin datos disponibles
- k) Presión de vapor sin datos disponibles
- l) Densidad de vapor sin datos disponibles
- m) Densidad relativa sin datos disponibles
- n) Solubilidad en agua sin datos disponibles
- o) Coeficiente de reparto n-octanol/agua sin datos disponibles
- p) Temperatura de autoinflamación sin datos disponibles
- q) Temperatura de descomposición sin datos disponibles
- r) Viscosidad sin datos disponibles
- s) Propiedades explosivas sin datos disponibles
- t) Propiedades comburentes sin datos disponibles

9.2 Otra información de seguridad sin datos disponibles

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

10.1 Reactividad sin datos disponibles

10.2 Estabilidad química sin datos disponibles

10.3 Posibilidad de reacciones peligrosas sin datos disponibles

10.4 Condiciones que deben evitarse sin datos disponibles

10.5 Materiales incompatibles Agentes oxidantes fuertes

10.6 Productos de descomposición peligrosos Otros productos de descomposición peligrosos - sin datos disponibles

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

11.1 Información sobre los efectos toxicológicos

Toxicidad aguda sin datos disponibles

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

Corrosión o irritación cutáneas sin datos disponibles

Lesiones o irritación ocular graves sin datos disponibles

Sensibilización respiratoria o cutánea sin datos disponibles

Mutagenicidad en células germinales Genotoxicidad in vitro - Humanos – linfocito test de micronúcleo Genotoxicidad in vitro - Humanos – linfocito intercambio de cromátides

Carcinogenicidad IARC: No se identifica ningún componente de este producto, que presente niveles mayores que o igual a 0,1% como agente carcinógeno humano probable, posible o confirmado por la (IARC) Agencia Internacional de Investigaciones sobre Carcinógenos.

Toxicidad para la reproducción sin datos disponibles

Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única Inhalación - Puede irritar las vías respiratorias.

Toxicidad específica en determinados órganos - exposiciones repetidas sin datos disponibles

Peligro de aspiración sin datos disponibles

Efectos potenciales sobre la salud

Inhalación Puede ser nocivo si se inhala. Provoca una irritación del tracto respiratorio.

Ingestión Puede ser nocivo en casa de ingestión.

Piel Puede ser nocivo si es absorbido por la piel. Provoca irritaciones de la piel.

Ojos Provoca irritación ocular grave.

Signos y Síntomas de la Exposición Según nuestras informaciones, creemos que no se han investigado adecuadamente las propiedades químicas, físicas y toxicológicas.

Información Adicional

RTECS: LK9276000

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

12.1 Toxicidad sin datos disponibles

12.2 Persistencia y degradabilidad sin datos disponibles

12.3 Potencial de bioacumulación sin datos disponibles

12.4 Movilidad en el suelo sin datos disponibles

12.5 Resultados de la valoración PBT y mPmB sin datos disponibles

12.6 Otros efectos adversos sin datos disponibles

13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN

13.1 Métodos para el tratamiento de residuos

Producto

Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Disolver o mezclar el producto con un solvente combustible y quemarlo en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador.

Envases contaminados Eliminar como producto no usado.

14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE

14.1 Número ONU

ADR/RID: - IMDG: - IATA: -

14.2 Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas

ADR/RID: Mercancía no peligrosa

IMDG: Not dangerous goods

IATA: Not dangerous goods

14.3 Clase(s) de peligro para el transporte

ADR/RID: - IMDG: - IATA: -

14.4 Grupo embalaje

ADR/RID: - IMDG: - IATA: -

14.5 Peligros para el medio ambiente

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

ADR/RID: no IMDG Marine Pollutant: no IATA: no

14.6 Precauciones particulares para los usuarios sin datos disponibles

15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA

La hoja técnica de seguridad cumple con los requisitos de la Reglamento (CE) No. 1907/2006.

15.1 Reglamentación y legislación en materia de seguridad, salud y medio ambiente específicas para la sustancia o la mezcla sin datos disponibles

15.2 Evaluación de la seguridad química sin datos disponibles

16. OTRA INFORMACIÓN

Otros datos

Copyright 2013 Sigma-Aldrich Co. LLC. Se autoriza la reproducción en número ilimitado de copias para uso exclusivamente interno. La información indicada arriba se considera correcta pero no pretende ser exhaustiva y deberá utilizarse únicamente como orientación. La información contenida en este documento está basada en el presente estado de nuestro conocimiento y es aplicable a las precauciones de seguridad apropiadas para el producto. No representa ninguna garantía de las propiedades del producto. La Corporación Sigma-Aldrich y sus Compañías Afiliadas, no responderán por ningún daño resultante de la manipulación o contacto con el producto indicado arriba. Diríjase a www.sigma-aldrich.com y/o a los términos y condiciones de venta en el reverso de la factura o de la nota de entrega.

SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

de acuerdo el Reglamento (CE) No. 1907/2006 Versión 5.2 Fecha de revisión 20.05.2014 Fecha de impresión 25.09.2014

SECCIÓN 1: Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa

1.1 Identificadores del producto

Nombre del producto: **Melatonin**

Referencia: M5250

Marca: Sigma

REACH No. : Un número de registro no está disponible para esta sustancia, ya que la sustancia o sus usos están exentos del registro, el tonelaje anual no requiere registro o dicho registro está previsto para una fecha posterior

No. CAS: 73-31-4

1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados

Usos identificados: Reactivos para laboratorio, Fabricación de sustancias

1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad

Compañía: Sigma-Aldrich Química, S.L.

Ronda de Poniente, 3

Aptdo. Correos 278

E-28760 TRES CANTOS -MADRID

Teléfono: +34 91 6619977

Fax: +34 91 6619642

E-mail de contacto: eurtechserv@sial.com

1.4 Teléfono de emergencia

Teléfono de Urgencia: 704100087

SECCIÓN 2: Identificación de los peligros

2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla

No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1272/2008.

Esta sustancia no está clasificada como peligrosa según la Directiva 67/548/CEE.

2.2 Elementos de la etiqueta

El producto no necesita ser etiquetado de acuerdo con las directivas de la Comunidad Europea o las respectivas leyes nacionales.

2.3 Otros Peligros - ninguno(a)

SECCIÓN 3: Composición/información sobre los componentes

3.1 Sustancias

Sinónimos: N-Acetyl-5-methoxytryptamine

Formula: C₁₃H₁₆N₂O₂

Peso molecular: 232,28 g/mol

No. CAS: 73-31-4

No. CE: 200-797-7

Según la normativa aplicable no es necesario divulgar ninguno de los componentes.

SECCIÓN 4: Primeros auxilios

4.1 Descripción de los primeros auxilios

Recomendaciones generales

Consultar a un médico. Mostrar esta ficha de seguridad al doctor que esté de servicio.

Si es inhalado

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

Si aspiró, mueva la persona al aire fresco. Si ha parado de respirar, hacer la respiración artificial. Consultar a un médico.

En caso de contacto con la piel

Eliminar lavando con jabón y mucha agua. Consultar a un médico.

En caso de contacto con los ojos

Lavarse abundantemente los ojos con agua como medida de precaución.

Si es tragado

Nunca debe administrarse nada por la boca a una persona inconsciente. Enjuague la boca con agua. Consultar a un médico.

4.2 Principales síntomas y efectos, agudos y retardados

Los síntomas y efectos más importantes conocidos se describen en la etiqueta (ver sección 2.2) y / o en la sección 11

4.3 Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente

sin datos disponibles

SECCIÓN 5: Medidas de lucha contra incendios

5.1 Medios de extinción

Medios de extinción apropiados

Usar agua pulverizada, espuma resistente al alcohol, polvo seco o dióxido de carbono.

5.2 Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla

Óxidos de carbono, óxidos de nitrógeno (NOx)

5.3 Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios

Si es necesario, usar equipo de respiración autónomo para la lucha contra el fuego.

5.4 Otros datos

sin datos disponibles

SECCIÓN 6: Medidas en caso de vertido accidental

6.1 Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia

Utilícese equipo de protección individual. Evite la formación de polvo. Evitar respirar los vapores, la neblina o el gas. Evitar respirar el polvo. Equipo de protección individual, ver sección 8.

6.2 Precauciones relativas al medio ambiente

No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado.

6.3 Métodos y material de contención y de limpieza

Recoger y preparar la eliminación sin originar polvo. Limpiar y traspalar. Guardar en contenedores apropiados y cerrados para su eliminación.

6.4 Referencia a otras secciones

Para eliminación de desechos ver sección 13.

SECCIÓN 7: Manipulación y almacenamiento

7.1 Precauciones para una manipulación segura

Evítese la formación de polvo y aerosoles.

Debe disponer de extracción adecuada en aquellos lugares en los que se forma polvo. Ver precauciones en la sección 2.2

7.2 Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades

Almacenar en un lugar fresco. Conservar el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Temperatura de almacenaje recomendada: -20 °C Conservar en un lugar seco.

7.3 Usos específicos finales

Aparte de los usos mencionados en la sección 1.2 no se estipulan otros usos específicos

SECCIÓN 8: Controles de exposición/protección individual

8.1 Parámetros de control

Componentes con valores límite ambientales de exposición profesional.

No contiene sustancias con valores límites de exposición profesional.

8.2 Controles de la exposición

Controles técnicos apropiados

Manipular con las precauciones de higiene industrial adecuadas, y respetar las prácticas de seguridad. Lávense las manos antes de los descansos y después de terminar la jornada laboral.

Protección personal

Protección de los ojos/ la cara

Use equipo de protección para los ojos probado y aprobado según las normas gubernamentales correspondientes, tales como NIOSH (EE.UU.) o EN 166 (UE).

Protección de la piel

Manipular con guantes. Los guantes deben ser inspeccionados antes de su uso. Utilice la técnica correcta de quitarse los guantes (sin tocar la superficie exterior del guante) para evitar el contacto de la piel con este producto. Deseche los guantes contaminados después de su uso, de conformidad con las leyes aplicables y buenas prácticas de laboratorio. Lavar y secar las manos. Los guantes de protección seleccionados deben de cumplir con las especificaciones de la Directiva de la UE 89/686/CEE y de la norma EN 374 derivado de ello.

Protección Corporal

Elegir la protección para el cuerpo según sus características, la concentración y la cantidad de sustancias peligrosas, y el lugar específico de trabajo. El tipo de equipamiento de protección debe ser elegido según la concentración y la cantidad de sustancia peligrosa al lugar específico de trabajo.

Protección respiratoria

Protección respiratoria no requerida. Donde la protección sea deseada Usar respiradores y componentes testados y aprobados bajo los standards gubernamentales apropiados como NIOSH (EEUU) o CEN (UE)

Control de exposición ambiental

No dejar que el producto entre en el sistema de alcantarillado.

SECCIÓN 9: Propiedades físicas y químicas

9.1 Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

- a) Aspecto Forma: polvo Color: blanco, crema
- b) Olor sin datos disponibles
- c) Umbral olfativo sin datos disponibles
- d) pH sin datos disponibles
- e) Punto de fusión/ punto de congelación Punto/intervalo de fusión: 116,5 - 118 °C - lit.
- f) Punto inicial de ebullición e intervalo de ebullición sin datos disponibles
- g) Punto de inflamación sin datos disponibles
- h) Tasa de evaporación sin datos disponibles
- i) Inflamabilidad (sólido, gas) sin datos disponibles
- j) Inflamabilidad superior/inferior o límites explosivos sin datos disponibles
- k) Presión de vapor sin datos disponibles
- l) Densidad de vapor sin datos disponibles
- m) Densidad relativa sin datos disponibles
- n) Solubilidad en agua sin datos disponibles
- o) Coeficiente de reparto n-octanol/agua sin datos disponibles
- p) Temperatura de autoinflamación sin datos disponibles
- q) Temperatura de descomposición sin datos disponibles
- r) Viscosidad sin datos disponibles
- s) Propiedades explosivas sin datos disponibles
- t) Propiedades comburentes sin datos disponibles

9.2 Otra información de seguridad

Solubilidad en otros disolventes

Etanol 50 g/l - soluble

SECCIÓN 10: Estabilidad y reactividad

10.1 Reactividad

sin datos disponibles

10.2 Estabilidad química

Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas.

10.3 Posibilidad de reacciones peligrosas

sin datos disponibles

10.4 Condiciones que deben evitarse

Luz

10.5 Materiales incompatibles

Agentes oxidantes fuertes

10.6 Productos de descomposición peligrosos

Otros productos de descomposición peligrosos - sin datos disponibles

En caso de incendio: véase sección 5

SECCIÓN 11: Información toxicológica

11.1 Información sobre los efectos toxicológicos

Toxicidad aguda DL50 Oral - rata - > 3.200 mg/kg

Corrosión o irritación cutáneas sin datos disponibles

Lesiones o irritación ocular graves sin datos disponibles

Sensibilización respiratoria o cutánea sin datos disponibles

Mutagenicidad en células germinales sin datos disponibles

Carcinogenicidad IARC: No se identifica ningún componente de este producto, que presente niveles mayores que o igual a 0,1% como agente carcinógeno humano probable, posible o confirmado por la (IARC) Agencia Internacional de Investigaciones sobre Carcinógenos.

Toxicidad para la reproducción

La exposición excesiva puede provocar trastornos del aparato reproductor, según pruebas realizadas en animales de laboratorio.

Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única sin datos disponibles

Toxicidad específica en determinados órganos - exposiciones repetidas sin datos disponibles

Peligro de aspiración sin datos disponibles

Información Adicional

RTECS: AC5955000

Según nuestras informaciones, creemos que no se han investigado adecuadamente las propiedades químicas, físicas y toxicológicas.

SECCIÓN 12: Información ecológica

12.1 Toxicidad sin datos disponibles

12.2 Persistencia y degradabilidad sin datos disponibles

12.3 Potencial de bioacumulación sin datos disponibles

12.4 Movilidad en el suelo sin datos disponibles

12.5 Resultados de la valoración PBT y mPmB

La valoración de PBT / mPmB no está disponible ya que la evaluación de la seguridad química no es necesaria / no se ha realizado

12.6 Otros efectos adversos sin datos disponibles

SECCIÓN 13: Consideraciones relativas a la eliminación

Evaluación histológica de la osteogénesis inducida por flavonoides en comparación con otro estimulador óseo en alveolos post extracción. Estudio experimental en perros American Fox Hound.

13.1 Métodos para el tratamiento de residuos

Producto

Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Disolver o mezclar el producto con un solvente combustible y quemarlo en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador.

Envases contaminados

Eliminar como producto no usado.

SECCIÓN 14: Información relativa al transporte

14.1 Número ONU ADR/RID: - **IMDG:** - **IATA:** -

14.2 Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas

ADR/RID: Mercancía no peligrosa

IMDG: Not dangerous goods

IATA: Not dangerous goods

14.3 Clase(s) de peligro para el transporte

ADR/RID: - **IMDG:** - **IATA:** -

14.4 Grupo embalaje

ADR/RID: - **IMDG:** - **IATA:** -

14.5 Peligros para el medio ambiente

ADR/RID: no **IMDG** Marine pollutant: no **IATA:** no

14.6 Precauciones particulares para los usuarios sin datos disponibles

SECCIÓN 15: Información reglamentaria

La hoja técnica de seguridad cumple con los requisitos de la Reglamento (CE) No. 1907/2006.

15.1 Reglamentación y legislación en materia de seguridad, salud y medio ambiente específicas para la sustancia o la mezcla sin datos disponibles

15.2 Evaluación de la seguridad química

Para este producto no se ha llevado a cabo una evaluación de la seguridad química

SECCIÓN 16: Otra información

Otros datos

Copyright 2014 Sigma-Aldrich Co. LLC. Se autoriza la reproducción en número ilimitado de copias para uso exclusivamente interno. La información indicada arriba se considera correcta pero no pretende ser exhaustiva y deberá utilizarse únicamente como orientación. La información contenida en este documento está basada en el presente estado de nuestro conocimiento y es aplicable a las precauciones de seguridad apropiadas para el producto. No representa ninguna garantía de las propiedades del producto. La Corporación Sigma-Aldrich y sus Compañías Afiliadas, no responderán por ningún daño resultante de la manipulación o contacto con el producto indicado arriba. Diríjase a www.sigma-aldrich.com y/o a los términos y condiciones de venta en el reverso de la factura o de la nota de entrega.